

MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN DER
SPERMIENPROTEINASE AKROSIN

RALPH M. SIMLER

1988

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

AN DER

SPERMIENPROTEINASE AKROSIN

DISSERTATION DER FAKULTÄT
FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

vorgelegt von
Ralph M. Simler
Juli 1988

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. W. Müller-Esterl
 2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. G. Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 1988

Meiner Mutter

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 1. 3. 1984 - 1. 5. 1988 an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand: Herr Prof. Dr. H. Fritz) angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Fritz.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. W. Müller-Esterl, der mich während der vier Jahre durch ermutigende Diskussionen und engagierte Betreuung unterstützte.

Bei Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen und Herrn Dr. H. Appelhans der TH Darmstadt möchte ich mich bedanken für das Erlernen der Grundtechniken des gentechnologischen Arbeitens.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt Herrn Pohl für Korrekturen, Frau Wind für technische Ratschläge zur Anfertigung der Arbeit und Frau Claudia Bruch für ihre Hilfe bei den Schreibarbeiten während meiner Krankheit.

Zuletzt bedanke ich mich bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen, die mich geduldig einarbeiteten, bei Experimenten unterstützten und durch selbstlose Mitarbeit diese Arbeit ermöglichten.

Inhalt

A.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
B.	EINLEITUNG.....	3
B. 1.	Aufbau des Spermatozoons.....	3
B. 2.	Aufbau des weiblichen Eis.....	4
B. 3.	Entwicklung des Spermatozoons	4
B. 3.1.	Spermatogenese.....	4
B. 3.2.	Kapazitation.....	5
B. 3.3.	Akrosomenreaktion.....	6
B. 4.	Bindung des Spermiums an das Ovum..	6
B. 5.	Penetration.....	7
B. 6.	Proteolytische Systeme.....	7
B. 7.	Katalysemechanismus von Serinproteinasen.....	8
B. 8.	Entdeckung der Spermienproteinase Akrosin.....	9
B. 9.	Physiologische Funktionen des Akrosins.....	10
B. 10	Biochemische Charakterisierung.....	10
B. 11.	Molekularer Aktivierungsmechanismus von Akrosin-Vorstufen.....	11
B. 12.	Aufgabenstellung.....	13
C.	MATERIAL UND METHODEN.....	14
C. 1.	Material.....	14
C. 1.1.	Geräte.....	14
C. 1.2.	Substanzen und Materialien.....	15
C. 2.	Methoden.....	18
C. 2.1.	Enzymimmunoassay.....	18
C. 2.1.1.	Indirekter ELISA.....	19
C. 2.1.2.	Kompetitiver ELISA.....	20
C. 2.2.	Diskontinuierliche SDS-Elektropho- rese in PAA-Gradienten-Gelen.....	20
C. 2.2.1.	Silberfärbung.....	21
C. 2.2.2.	Fluorographie.....	22
C. 2.2.3.	Western-Blotting.....	22
C. 2.2.4.	Immunoprint.....	23
C. 2.3.	Plaque-Immundetektion.....	24

C. 2.4.	Native Agarose-Gele.....	24
C. 2.5.	Sequenzierung.....	25
C. 2.5.1.	Herstellung eines Sequenzgels.....	26
C. 2.5.2.	Hybridisierungsreaktion.....	26
C. 2.5.3.	Polymerasereaktion.....	26
C. 2.5.4.	Gelelektrophorese.....	27
C. 2.6.	Proteinchemische Methoden.....	27
C. 2.6.1.	Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose.....	27
C. 2.6.2.	Immunselektion.....	28
C. 2.6.3.	Vakuumdialyse.....	29
C. 2.6.4.	Ammonsulfatfällung.....	29
C. 2.6.5.	Biotinylierung von Immun- globulinen.....	29
C. 2.6.6.	¹²⁵ I-Markierung.....	30
C. 2.7.	Immunologische Methoden.....	31
C. 2.7.1.	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	31
C. 2.7.2.	Immunisierung.....	31
C. 2.7.3.	Myelomzellen.....	31
C. 2.7.4.	Gewinnung von Makrophagen.....	32
C. 2.7.5.	Zellfusion.....	32
C. 2.7.6.	Subklonierung.....	33
C. 2.7.7.	Aszitesproduktion.....	33
C. 2.8.	Gentechnologische Methoden.....	33
C. 2.8.1.	RNA-Gewinnung	33
C. 2.8.2.	Oligo dT-Säulenchromatographie.....	34
C. 2.8.3.	Herstellung von Retikulozyten- lysats.....	35
C. 2.8.3.1.	Anämisierung von Kaninchen.....	36
C. 2.8.3.2.	Gelfiltration des Retikulozyten- lysats.....	37
C. 2.8.4.	Zellfreie Proteinbiosynthese.....	37
C. 2.8.5.	Immunpräzipitation.....	38
C. 2.9.	Mikrobiologische Arbeiten.....	39
C. 2.9.1.	Zellkulturen.....	39
C. 2.9.2.	Amplifikation von Genbanken und Phagenklonen.....	40
C. 2.9.3.	Isolierung von Lambda-DNA im analytischen Maßstab.....	41
C. 2.9.4.	Isolierung von Lambda-DNA im präparativen Maßstab.....	42

C. 2.9.5.	Restriktionskartierung.....	44
C. 2.9.6.	Isolierung des Fusionsproteins.....	45
C. 2.9.7.	Umklonierung in den Sequenzierungs- vektor M13.....	46
D.	ERGEBNISSE.....	49
D. 1.	Immunchemische Arbeiten.....	49
D. 1.1.	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	49
D. 1.2.	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	49
D. 1.3.	Western-Blotting.....	50
D. 1.4.	Bestimmung des relativen Titters....	52
D. 1.5.	Bestimmung der Epitopspezifität....	53
D. 1.6.	Subtypisierung der monoklonalen Antikörper.....	54
D. 2.	RNA-Techniken.....	55
D. 2.1.	Gewinnung von Gesamt-RNA.....	55
D. 2.2.	Gewinnung von poly-A ⁺ RNA.....	55
D. 2.3.	Herstellung von Retikulozyten- lysats.....	55
D. 2.4.	Optimierung der zellfreien Proteinbiosynthese.....	57
D. 2.5.	Immunpräzipitation.....	62
D. 3.	Mikrobiologische Arbeiten.....	64
D. 3.1.	Untersuchung einer humanen testikulären cDNA-Bank.....	64
D. 3.2.	Kontrollen.....	65
D. 3.3.	DNA- und Fragmentisolierung.....	68
D. 3.4.	Ligation von isolierten cDNA- Fragmenten mit M13.....	69
D. 3.5.	Isolierung einzelsträngiger rekombinanter M13-DNA.....	70
D. 3.6.	Untersuchung des Klons AI-2.....	71
D. 3.6.1.	Sequenzierung des Klons AI-2.....	71
D. 3.6.2.	Vergleich mit den Proteinsequenz- daten von Eberakrosin.....	76
D. 3.6.3.	Vergleich mit der Aminosäurezusam- mensetzung von Human- und Eber- akrosin.....	78



D. 3.6.4.	Vergleich mit anderen Proteinen....	79
D. 3.6.5.	Charakterisierung des hypothe- tischen Proteins von Klon AI-2.....	80
D. 3.6.5.1.	Hydropathisches Profil.....	81
D. 3.6.5.2.	Sekundärstruktur des Proteins AI-2.....	82
D. 3.7.	Untersuchung des Klon AII-9.....	82
D. 3.7.1.	Sequenzierung.....	82
D. 3.7.2.	Kartierung.....	83
D. 3.7.3.	Vergleich mit den Sequenzdaten von Eberakrosin.....	92
D. 3.7.4.	Vergleich mit anderen Proteinen....	93
D. 3.7.5.	Isolierung von Fusionsproteinen....	94
D. 3.7.6.	Western-Blotting.....	96
E.	DISKUSSION.....	98
E. 1.	Immunpräzipitation.....	99
E. 2.	Sichten der cDNA-Bank.....	100
E. 2.1.	Klon AI-2.....	100
E. 2.2.	Klon AII-9.....	102
E. 3.	Zusammenfassende Beurteilung.....	103
E. 4.	Ausblick.....	107
F.	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
G.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	120
H.	LEBENS LAUF.....	121

A.

Zusammenfassung

Akrosin ist eine Serinprotease mit Trypsin-ähnlicher Spalt-spezifität. Es ist bekannt, daß es in einer inaktiven Vorstufe ("Proakrosin") synthetisiert wird. Die Expression seiner Aktivität scheint über einen Mehrstufen-Mechanismus reguliert zu sein. Um Hinweise über die Struktur der Proteinase und ihren molekularen Aktivierungsmechanismus zu erhalten, wurden immunologische und gentechnologische Untersuchungen angestellt.

1.) Es wurden monoklonale Antikörper gegen Eberakrosin in Mäusen nach der Methode von Köhler und Milstein erzeugt. Aus einer Fusion konnten vier Antikörper erhalten werden. Sie sind alle gegen das gleiche Epitop des Akrosins gerichtet, besitzen aber verschiedene Subtypen (IgM, IgG₁) mit leichten Ketten vom kappa- bzw. lambda-Typ.

2.) Aus Ebertestes wurde poly-A⁺ RNA isoliert und ihre Verwertbarkeit als translatierbares Material getestet. Es konnte intakte poly-A⁺ RNA isoliert werden, die für Proteine mit Molekularmassen von ca. 10.000 bis 100.000 Da kodiert. Aus zellfreien Translataten konnten mittels immobilisierter Antikörper gegen Eberakrosin zwei Proteinbanden mit den apparenten Molekularmassen 46 kDa (Hauptprodukt) und 25 kDa (Nebenprodukt) isoliert werden.

3.) Zur Isolierung von für Akrosin codierender cDNA wurde eine Expressionsbank im Lambda-Phagen gt 11 untersucht, die aus menschlicher Testes-mRNA hergestellt worden war. Als Sonden dienten immunselektierte polyklonale Antikörper gegen Eberakrosin. Insgesamt konnten 17 Klone nach drei Testrunden isoliert werden; davon wurden zwei (AI-2, AII-9) für die Sequenzierung ausgewählt.

4.) Einer der beiden Klone trägt die Bezeichnung AI-2. Seine Sequenzierung erfolgte über "primer-directed sequence analysis", bei der spezifische Oligonukleotide als Primer dienen. Diese wurden sukzessive nach vorangehenden Sequenzdaten synthetisiert. Die cDNA umfaßt 1715 Bp und kodiert für ein Protein von 571 Aminosäuren. Ähnlichkeiten dieser vorhergesagten Sequenz mit bisher bekannten Partial-Sequenzdaten von Eberakrosin waren nicht zu finden. Dagegen wurde eine signifikante Sequenz-Ähnlichkeit zu Anaphylatoxin C4a und seiner Vorstufe (C4) des menschlichen Komplementsystems gefunden (33 % Identität).

5.) Klon AII-9 trägt eine Insertion von 2,5 kb mit zwei internen Eco RI-Spaltstellen, wodurch bei Eco RI-Restriktion drei Fragmente mit den Größen 600, 800 und 1100 Bp erhalten werden.

6.) In Kontrollexperimenten reagierte dieser Klon schwach positiv mit einem Gemisch von drei monoklonalen Antikörpern. Sein Fusionsprotein, mit einem Fremdanteil von ca. 4 - 5 kDa, wird im Immunoprint von polyklonalen Antikörpern gegen Eberakrosin detektiert.

7.) Die Sequenzanalyse der drei cDNA-Fragmente ergab, daß die cDNA-Insertion von Klon II-9 insgesamt 2604 Bp lang ist. Durch Restriktionskartierung konnte die Orientierung der einzelnen Fragmente relativ zum lac z-Gen ermittelt werden.

8.) Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von AII-9 umfaßt lediglich 25 Reste; sie weist keine signifikante Homologie zu den bekannten Akrosin-Sequenzen oder zu Sequenzen anderer Proteine auf. Da aber über den C-Terminus von Akrosin noch keine Aminosäuresequenzdaten vorliegen, ist es denkbar, daß dieses vorhergesagte Peptid den C-Terminus der Proteinase repräsentiert.

9.) Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der authentischen Akrosin-cDNA sind im Gange.

B.

EINLEITUNG

B. 1.

Aufbau des Spermatozoons

Die männliche Keimzelle besteht im wesentlichen aus Kopf, Schwanz und Mittelstück. Der 3 - 5 μ m lange ellipsoide Kopf enthält den Zellkern mit dem dicht gepackten haploiden Chromosomensatz und das Akrosom, ein differenziertes Lysosom, mit einer Vielzahl hydrolytischer Enzyme (Gilboa, 1973). Im reifen Spermatozoon erstreckt es sich über ca. 2/3 des anterioren Teils bis zum Äquatorialreifen. Hier verschmelzen drei Membranen miteinander: die innere und die äußere akrosomale Membran, die den akrosomalen Inhalt einschließen, und die Plasmamembran, die das gesamte Spermium überzieht (Alberts et al., 1987). Der ca. 50 μ m lange Schwanz des Spermatozoons besteht aus dickeren Außen- und dünneren Innenfibrillen. Die Außenfibrillen dienen als kontraktile Elemente, die für die geißelartige Bewegung der Spermien verantwortlich sind. Die für die Fortbewegung erforderliche Energie liefern die Mitochondrien im Mittelstück (Ludvic, 1976).



Abb.1. Schematischer Aufbau des Spermiums

B. 2.

Aufbau des weiblichen Eis

Die Oozyte von Säugern ist von vier Schichten umgeben: Dem diffusen Cumulus oophorus, den Spermienrezeptoren enthaltenden Schichten der Corona radiata und der Zona pellucida. Als letzte Hülle umschließt die Vitellinmembran die weibliche Keimzelle. Bei der Maus besteht die Zona pellucida aus drei Glycoproteinkomponenten: ZP1 ZP2 und ZP3. Die letztere wurde von Bleil und Wassarman 1980 als Spermienrezeptor charakterisiert.

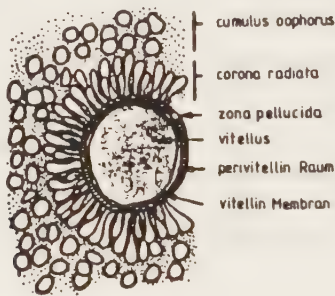


Abb.2. Schematischer Aufbau des Eis

B. 3.

Entwicklung des Spermatozoons

B. 3.1.

Spermatogenese

Während der Embryogenese wandern Urkeimzellen in die Testis und sammeln sich dort als unreife Spermatogonien in der äußeren Peripherie, der sog. Basalmembran. Mit der Geschlechtsreife des Lebewesens beginnt auch die Reifung der Keimzellen, die mit zunehmender Differenzierung von der Peripherie lumenwärts wandern (Ludvic, 1976). Durch mitotische Teilung entstehen aus den Spermatogonien die Spermatozyten, aus denen durch zwei meiotische Teilungen die Spermatiden hervorgehen. Beim Übergang von den Spermatiden zu den Spermatozoa machen die Keimzellen größere morphologische Änderungen durch; u.a. bildet sich der für die spätere Eigenmotilität notwendige Schwanz aus und aus dem Golgiap-

parat der Keimzelle geht das für die Gametenfusion wichtige Akrosom (s.o.) hervor (Flörke-Gerloff, 1985). Vom Lumen der Testis werden die reifen Spermatozoa über die Rete testis zum Caput epididymis transportiert. Auf ihrem anschließenden Weg zur Cauda epididymis erfahren die Spermatozoa weitere biochemische und morphologische Veränderungen, sodaß sie bei ihrer Ankunft in der Cauda zur Ejakulation bereit sind (Ludvic, 1976).

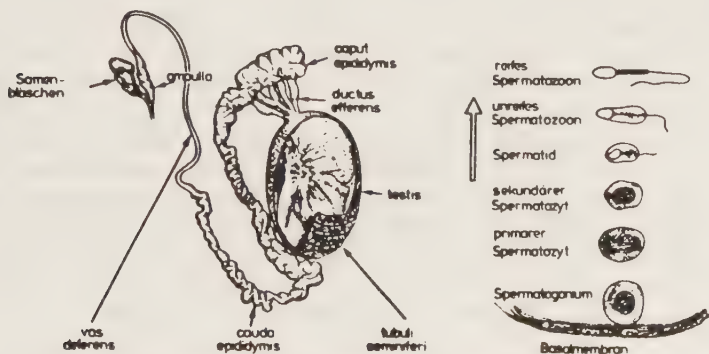


Abb.3. Darstellung des männlichen Geschlechtsstrakts und Reifung der männlichen Keimzelle

B. 3.2. Kapazitation

Ejakulierte Spermatozoa per se sind weder bewegungs- noch befruchtungsfähig. Erst außerhalb des männlichen Genitaltraktes erleben sie die Veränderungen, die sie befruchtungsfähig machen - ausgelöst durch Substanzen des weiblichen Genitaltraktes oder des Eis selbst (Chang, 1951). Durch diesen Prozeß, allgemein als Kapazitation bezeichnet, werden Makromoleküle der Spermienoberfläche entweder entfernt oder so verändert, daß integrale Membranproteine der Plasmamembran des Spermatozoons exponiert und damit zugänglich werden (Yanagimachi, 1987). Obwohl es bis heute nicht möglich ist, die Kapazitation eindeutig zu definieren, ist es klar, daß sie den planmäßigen Ablauf der Fertilisation gewährleistet. Die zeitliche und räumliche Abfolge kann speziebedingte an die Akrosomenreaktion gekoppelt sein, ist aber ansonsten als eine von ihr unabhängige Reaktion zu sehen (Voglmayr, 1987).

B. 3.3. Akrosomenreaktion

In räumlich enger Beziehung zur Zona pellucida machen Spermatozoa eine dramatische morphologische Veränderung durch, die sog. Akrosomenreaktion. Darunter versteht man die Fusion und Vesikularisierung der Spermienplasma- mit der äußeren akrosomalen Membran, die dadurch bedingte Freisetzung des akrosomalen Inhalts und die Exposition der inneren akrosomalen Membran mit ihren assoziierten Enzymen (Wassarman, 1987). Die Induktion der Akrosomenreaktion erfolgt möglicherweise durch die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida, die über Rezeptoren einem Ca^{++} -Strom durch die Spermien-Plasmamembran bewirkt. Dadurch steigt intrazellulär der pH-Wert, wodurch letztendlich Plasmamembran und äußere akrosomale Membran labilisiert werden und miteinander verschmelzen (Vaquier, 1986).

B. 4. Bindung des Spermiums an das Ovum

Im Gegensatz zu Invertebraten binden Säuger-Spermatozoa mit intaktem Akrosom horizontal an die Zona pellucida des Eis (Wassarman, 1987). Da diese Reaktion hoch Spezies-spezifisch ist, wurde vermutet, daß für diese Bindung Spermien-Rezeptoren der Zona pellucida verantwortlich sind. Tatsächlich wurde bei der Untersuchung der Zona pellucida der Maus ein Glycoprotein (ZP3) gefunden, das Spermien-Bindungs-Aktivität besitzt (Bleil & Wassarman, 1980). Die Spezifität der Bindung rührt von den Zuckerketten des Glycoproteins her, an das Proteine der äußeren akrosomalen Membran binden. Diese Spermien-Proteine sind Lectine, Glycosyltransferasen und Glycosidasen; ebenso konnte ein Trypsin-ähnliches Enzym als Zona-bindendes Protein charakterisiert werden (Saling, 1981).

B. 5.

Penetration

Das Spermium bindet mittels eines Lectin-ähnlichen Moleküls an den Spezies-spezifischen Rezeptor (Brown & Jones, 1987). Durch die Bindung wird eine Spermienprotease aktiviert, die den Zona-Rezeptor spaltet und damit das Lectin-ähnliche Molekül des Spermiums wieder freigibt (Töpfer-Petersen, 1987a & 1987b). Falls das Spermium motil ist, kann es sich in der Zona weiter vorwärts zu einem neuen Rezeptor bewegen, an diesen per Lectin-ähnlichem Molekül binden, worauf der Mechanismus von neuem beginnt, bis die Zona durchdrungen ist (O'Rand et al., 1986).

Andere Hypothesen besagen, daß das Spermium rein mechanisch die poröse, nur durch schwache van der Waals-Kräfte zusammengehaltene Zona pellucida durchdringt. Da die Flagella anhaftender Spermien noch sehr stark schlagen, haben sie eventuell noch genügend Energie, um nach erfolgter Akrosomenreaktion die Zona mechanisch zu penetrieren (Flechón et al., 1987).

B. 6.

Proteolytische Systeme

Mit der Bezeichnung Protease werden Proteine benannt, die andere Proteine durch Hydrolyse von Peptidbindungen degradieren (Neurath, 1964). Allgemein können die Proteasen in zwei Klassen eingeteilt werden: Proteinasen oder Endo-Proteasen, die endogene Peptidbindungen in Proteinen spalten und Peptidasen oder Exopeptidasen, die exogene Peptidbindungen hydrolysieren (Barrett, 1986). Proteinasen oder die auf ihnen basierenden proteolytischen Systeme sind in der belebten Natur weit verbreitet. So lassen strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zwischen den Proteinasen von Vertebraten bzw. Bakterien darauf schließen, daß sie eine essentielle Rolle bei lebenserhaltenden Prozessen spielen (Neurath & Walsh, 1976). Die Funktion von Proteinasen umfaßt im einfachsten Fall die Digestion für anabolische Vorgänge und reicht bis zu komplexen Kontrollmechanismen, die durch limitierte Proteolyse anderer Proteinasen im Kaskadenverband ausgeübt werden (Neurath, 1984). Dabei spiegeln sich einfache proteolytische Funktionen in einfachen Strukturen wider,

während fein abgestimmten Kontrollaufgaben auch komplizierte Strukturen zugrunde liegen (Patthy, 1985). So sind pankreatische Serinproteasen Einkettenmoleküle mit einer Molekülmasse von ca. 25 kDa (Stroud, 1976); Serinproteasen mit Kontrollfunktionen besitzen dagegen neben der Proteaseeinheit aminoterminal zusätzlich Proteinstrukturen unterschiedlicher Eigenschaften. Derart komplexe Proteinase wirken nicht nur als Spezialisten der Blutgerinnung (Davie et al., 1979) und der Komplementaktivierung (Reid & Porton, 1981), sondern auch als Regulatoren der Fibrinolyse (Wiman & Colten, 1978) und der Gametenfusion (Morton, 1977).

Die derzeit bekannten Proteinase werden vier großen Superfamilien zugeordnet:

1.) Serinproteinase, 2.) Cysteinproteinase, 3.) Aspartatproteinase und 4.) Metallproteinase.

Zur Superfamilie der Serinproteinase zählt man die Familie der pankreatischen Enzyme Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Kallikrein, sowie die Familie der bakteriellen Proteinase vom Typ des Subtilisins (Neurath, 1976).

B. 7. Katalysemechanismus von Serinproteinase

Der mechanistische Ablauf der Proteolyse eines Substrats durch eine Proteinase ist am Beispiel von Trypsin geklärt worden. Das Trypsinmolekül besteht im wesentlichen aus zwei Domänen. Die Domäne II enthält die zwei wichtigen Zentren: Eine Vertiefung, die als Bindungstasche für das Substrat fungiert. Die Geometrie dieser Tasche bestimmt über chemische Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat sowohl die Spezifität des Enzyms, als auch die für die Hydrolyse optimale Lage und Konformation des Substrats (Bode, 1979).

Als katalytisches Zentrum dient die Triade Aspartat (Position 102), Histidin (Position 57) und Serin (Position 195). Die durch die Nachbarschaft von Aspartat über Histidin stark polarisierte OH-Gruppe der Serins (195) greift, nachdem das Substrat in die Bindungstasche optimal eingepasst ist, nun nucleophil die Arginyl- bzw. Lysyl-Peptidbindung an (Bode & Huber, 1986). Das Carbonylatom der Carboxylgruppe des Arginins oder Lysins bildet dabei einen tetraedrischen Zwischenzustand aus. Als primäres Zwischenprodukt entsteht das durch das Substrat acylierte Enzym. Der freie Aminoterminus

des Substrats diffundiert nun ab, während der über eine Acyl-Bindung an Serin (195) gebundene C-Terminus säurekatalysiert - wiederum über einen tetraedrischen Zwischenzustand - durch H_2O abgespalten wird (Stroud, 1976). Die Stabilisierung dieser energiereichen Zwischenstufen erfolgt durch Wasserstoffbrücken der Stickstoff-Atome der Amidgruppen von Serin (195) und Glycin (193) (sog. Oxoanion-Bindungsloch) (Bode, 1979).

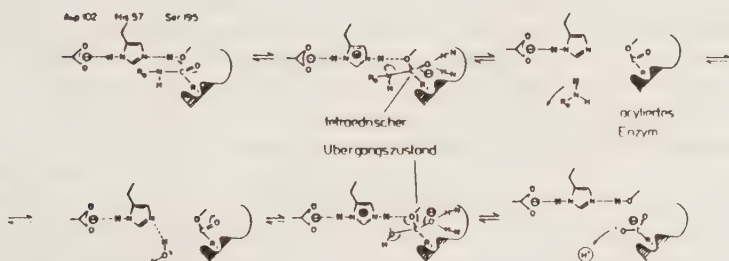


Abb.4. Hydrolyse-Mechanismus einer Serin-Proteinase

B. 8. Entdeckung der Spermienproteinase Akrosin

1930 beobachtete Yamane erstmals, daß wässrige Spermienextrakte proteolytische Aktivität aufweisen. Fünf Jahre später zeigte er, daß die Zona pellucida durch Spermienextrakte hydrolysiert wird. In den nachfolgenden vierzig Jahren erschienen viele Arbeiten, die bewiesen, daß Spermatozoa von Säugern proteolytische Enzyme besitzen. Unter den vielen enzymatischen Aktivitäten gibt es eine, die der des pankreatischen Trypsins ähnlich ist und von daher als "Trypsin-ähnliches Enzym aus Spermatozoa" in der Literatur Eingang fand. 1970 schlug Zanefeld für dieses Enzym den Namen Akrosin vor.

Mittlerweile sind Akrosin-ähnliche Enzyme bei vielen Säugern, Vögeln, Amphibien und auch beim Seeigel nachgewiesen worden. 1972 isolierten Fink et al. Eberakrosin und Fritz et al. humanes Akrosin. Mit der Isolierung tauchten auch die ersten Hinweise dafür auf, daß Akrosin in einer inaktiven

Zymogenform ("Proakrosin") synthetisiert wird. Als Sitz für das inaktive Proenzym postulierte Morton 1975 die innere akrosomale Membran.

B. 9. Physiologische Funktionen des Akrosins

Nachdem gezeigt worden war, daß Akrosin-Inhibitoren (Morton, 1977) und Akrosin-spezifische Antikörper die Verschmelzung von Spermium und Ovum verhindern können (Zanefeld et al., 1973; Podell & Vaquier, 1984), war dieser Proteinase die Schlüsselrolle bei der Fertilisation zugewiesen (Polakoski & Siegel, 1986). Derzeit wird vermutet, daß Akrosin die Zona pellucida proteolytisch abbaut und damit dem Spermium einen Weg zur Gametenverschmelzung bahnt (Stambaugh & Buckley, 1968). Weitere postulierte Funktionen dieses Enzyms sind: die Freisetzung von Kininen aus Kininogenen, die einerseits die Spermienmotilität erhöhen (Schill & Haberland, 1974) und andererseits die Viskosität des Cervix mucus erniedrigen (Schumacher & Zanefeld, 1974). Weiterhin wird spekuliert, daß Akrosin nach Verschmelzung der Gameten das Chromatingerüst des Spermiums abbaut (Marushige & Marushige, 1975). Akrosin soll auch die Akrosomenreaktion (siehe B. 3.3.) induzieren (Meizel & Lui, 1976) und für die Initialbindung des Spermiums an die Zona verantwortlich sein (Töpfer-Petersen & Henschen, 1987b). Bemerkenswerterweise konnte bisher jedoch keine dieser Funktionen in biochemisch eindeutiger Weise bestätigt werden (Polakoski & Siegel, 1986).

B. 10. Biochemische Charakterisierung

Akrosin wird in einer inaktiven Vorstufe mit einem apparenten Molekulargewicht von 50/53 kDa synthetisiert. Durch stufenweise Prozessierung des Proakrosins entstehen drei multiple Formen des aktiven Enzyms (Schleuning et al, 1976). 1984 publizierten Fock-Nüzel et al. Proteinsequenzdaten der 38 kDa-Form des Eberakrosins. Durch diese Arbeit konnte auch gezeigt werden, daß diese Form des Akrosins aus zwei Ketten besteht: einer leichten mit 23 Aminosäuren bekannter Sequenz (Fock-Nüzel et al., 1980) und einer schweren Kette von ca.

320 Aminosäuren mit unvollständiger Sequenz. Beide Ketten sind über zwei Disulfidbrücken verbunden (Biochemische Daten dieses Proteins siehe Tab.1.).

Tab.1.

	Gesamt Molekül	leichte Kette	schwere Kette
Anzahl der Aminosäuren	ca. 340	23	ca. 320
Molekulargewicht (Dalton)	ca. 40.000	4.200	ca. 38.000
N-Terminus (die ersten vier Aminosäuren)		Arginin Aspartat Asparagin Alanin	Valin Valin Glyzin Glyzin
Anzahl der Cysteinmoleküle	8	2	6
Kohlenhydratrest (mol Monosaccharide pro mol Protein)	9	9	0
spez. Aktivität U/mg Protein	37		
Isoelektr. Punkt	10,5		

B. 11. Molekularer Aktivierungsmechanismus von Akro- sin-Vorstufen

Akrosin wird in Form einer enzymatisch inaktiven Vorstufe, dem Proakrosin, synthetisiert. Der detaillierte Mechanismus bzw. Zeitpunkt der Proenzymaktivierung ist bislang noch ungeklärt; vermutlich handelt es sich um einen komplexen Vorgang, an dem zahlreiche Proteine beteiligt sind, die das Akrosin-Proakrosin-System beeinflussen oder regulieren. Einige Proteine binden spezifisch an Proakrosin, einige inhibieren die Umwandlung von Proakrosin in Akrosin und andere hemmen die enzymatische Aktivität (Polakoski & Siegel, 1986). Derzeit werden vier mögliche Aktivierungsmechanismen diskutiert:

1.) Intramolekulare Aktivierung des Proenzyms

Kinetische Messungen von Kennedy & Polakoski (1981) deuten darauf hin, daß das Zymogen selbst geringe Proteaseaktivität besitzt. Diese Aktivität reicht aus, daß Proakrosin sich intramolekular spaltet und so autokatalytisch von der Proenzymform in das aktive Enzym übergehen kann. Dieselbe Forschergruppe konnte auch zeigen, daß bei der Aktivierung zahlreiche Zwischenstufen durchlaufen werden, die selbst noch enzymatische Aktivität aufweisen.

2.) Aktivierung des Proenzyms durch andere Proteinasen

Verschiedene Gruppen (McRorie et al., 1976; Siegel et al., 1984) isolierten aus akrosomalem Gewebe Trypsin-ähnliche Enzyme, die sich in ihrer Spezifität von Akrosin unterscheiden. Das Vorkommen anderer Proteinasen läßt einen weiteren Mechanismus möglich erscheinen: das inaktive Proenzym ist an die innere akrosomale Membran gebunden. Durch eine erste Spaltung des Proenzyms erfolgt die Aktivierung zum Enzym, das weiter membrangebunden bleibt. Durch einen weiteren Schnitt entsteht dann ein kleineres Akrosinmolekül, das von der Membran abdiffundieren kann (Berruti et al., 1984).

3.) Dissoziation des Akrosin-Inhibitor-Komplexes

Bis 1982 waren mehrere Akrosininhibitoren aus Seminalplasma und Seminalvesikeln isoliert worden. Bis dahin vermutete man, daß diese Inhibitoren einen Schutz gegen proteolytische Schädigung des weiblichen Genitaltraktes durch Akrosin darstellen. 1982 isolierten jedoch Tschesche et al. einen intraakrosomalen Inhibitor aus Eberspermatozoa. Die Autoren vermuten, daß der Akrosininhibitor vorzeitig aktiviertes Akrosin hemmt. Bei der Akrosomenreaktion (siehe B. 3.3.) wird der Enzym-Inhibitor-Komplex aus dem Akrosom freigesetzt. Die Folge ist, daß der Akrosininhibitor vom Enzym abdiffundiert und damit eine Aktivierung von Proakrosin ermöglicht.

4.) Aktivierung durch Lipide

Es ist bekannt, daß sich während der Kapazitation die Lipid-Zusammensetzung der Spermatozoa-Membranen ändert. Während der Kapazitation (siehe B. 3.2.) findet vermutlich auch der Übergang von Pro- in Akrosin statt. Parrish et al. (1978) stellten fest, daß negativ geladene Phospholipidvesikel die Autoaktivierung von Proakrosin katalysieren können. Die

Funktion der Lipide könnte sein, zwei Proakrosin-Moleküle in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander zu bringen, sodaß die Wahrscheinlichkeit einer intermolekularen Hydrolyse erhöht wird.

B. 12. Aufgabenstellung

Angesichts der zentralen Rolle von Akrosin bei der Verschmelzung der Keimzellen, den ungeklärten Details bei seiner Aktivierung und der unvollständigen Sequenzinformation zu diesem Molekül ergab sich als Aufgabenstellung die gentechnologische Untersuchung der Organisation und Struktur der für Akrosin kodierenden cDNA. Im einzelnen waren geplant:

- Isolierung und Charakterisierung von testikulärer poly-A⁺ RNA
- Translation dieser testikulären poly-A⁺ RNA
- Immunpräzipitation der Translationsprodukte mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen Eberakrosin
- Isolierung und Sequenzierung der zugehörigen cDNA
- Isolierung und Charakterisierung der von ihr kodierten Fusionsproteine
- Analyse der aufgrund der cDNA-Daten vorhergesagten Aminosäurezusammensetzung

C.

MATERIAL UND METHODEN

C.1. Material

C.1.1. Geräte

- Elektrophoresen

Flachgelelektrophoresekammer (vertikales Gelelektrophorese-System), Nr. 1070, Modell V 161 (Fa. BRL, Neu-Isenburg); Spannungsgerät, Typ 2197; Transblotkammer Multiphor II Nova Blot, Typ 2117-005/250; Miniphor Elektrophoresekammer, Nr. 2013-001; Maxiphor Elektrophoresekammer, Nr. 2012-001, (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg)

- DNA-Sequenzierung

Makrophor Sequenzierkammer, Nr. 2010-001; Spannungsgerät Makrodrive 5, Nr. 2297-012; MultiTemp II Thermostat/ Kryostat, Nr 2219-002; Makromould Gelgießstand, Nr. 2010-100 (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg)

- Hybridomatechnik

Airflow, Clean Air, Typ DLF/BSS6 (Fa.Schrader, Göttingen); Zentrifuge, Modell 1200 (Fa. Hettich, Tuttlingen); Invert-Mikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen); Begasungs-Brutschrank, Typ B 5060 EK/CO₂ (Fa. Heraeus, Hanau); Wasserbad UL 30 (Fa. Binder, Tuttlingen); Diluter Microlab (Fa. Hamilton, Darmstadt); Microdispenser (Autodrop), Elisa-Waschgerät, Titer-tek, Typ 120 (Fa. Flow Laboratories, Meckenheim); Micro-ELISA-Photometer MR 580, (Fa. Dynatech, Denkendorf); Dewargefäß (50 l) (Fa. Cryoson, Schöllkrippen)

- Mikrobiologische Techniken

Präzisionsbrutschränke, Typ B 5060 E (Fa. Heraeus, Hanau); Zentrifugen Centrikon H-401 (Fa. Kontron, Eching); Inkubator, Typ IHT-1 und Tisch-Universalschüttler, Typ TU-1 (Fa. B. Braun, Melsungen); Sterile Arbeitsbank, Typ Uniflow UVUB 1200 Biohazard (Fa. Uniequip, München); Laborautoklav, Typ HST 410 (Fa. Dr. Morand, Aclens-Lausanne); Trockenschrank, Typ UL 30 (Fa. Memmert, Schwabach); Wasserbad, Typ Exatherm U3 electronic (Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach); Spektral-

photometer, Typ Eppendorf (Fa. Netheler & Hinz, Hamburg); Lyophilisationszentrifuge (Fa. Savant, New York); Mixer (Fa. Warren Blender)

- weitere Geräte

Computer QX 10, Matrixdrucker FX-80, Plotter HI-80, (Fa. Epson, München); Olivetti M 24 (Fa. Olivetti, München); pH-Meter 12 S bzw. 114 D (Fa. Püschel, München); Tischzentrifuge Typ 3200 (Fa. Eppendorf, Hamburg); Zentrifugen Centrikon H-401 bzw. T 2055 (Fa. Kontron Hermle, Eching); peristaltische Pumpe, Typ Perpex 10200 (mit austauschbaren Getrieben); Durchflußphotometer, Typ 2238 (Extinktionsmessung bei 280 nm); Ultrorac Fraktionssammler, Typ 7000; Schreiber, Typ 2210 (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg)

C. 1.2. Substanzen und Materialien

- Elektrophoresen

Natriumdodecylsulfat (SDS), Nr. 20760 (Fa. Serva, Heidelberg); Dithiothreitol (DTT), Nr. 161-0611 (Fa. Bio-Rad, München); Markerproteine für SDS-Gele: Myosin (schwere Kette, 200 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase B (92,5 kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitor (21,5 kDa), Lysozym (14 kDa) Nr. 161-0304/161-0303 (Fa. Bio-Rad, München); Nitrocellulose (0,45 μ m Porengröße), Nr. 401196 (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel); 4-Chlor-1-naphthol, Nr. C8890; Avidin, Nr. A9275; biotinylierte Peroxidase, Nr. P9272 (Fa. Sigma, Deisenhofen); Rinderserumalbumin (BSA), Nr. 735108 (Fa. Boehringer, Mannheim); Agarose, LE, Nr. 50004, Seakem (Fa. Biozym, Hameln); Agarose, Typ II, Nr. A-6877 (Fa. Sigma, Deisenhofen); DE81-Papier, Nr. 3658915, Whatman (Fa. Vetter, Wiesloch); Ethidiumbromid (EtBr), Nr. 21238 (Fa. Serva, Heidelberg); Lambda-DNA, Nr. 00866-74 (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg); DNA-Marker (ϕ x-174/Hae III): 1353 Bp, 1078 Bp, 872 Bp, 603 Bp, 310 Bp, 281 Bp, 271 Bp, 231 Bp, 194 Bp, 118 Bp, 72 Bp; Nr. 56611SA (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

- DNA-Sequenzierung

Acrylamid, Nr. 10675; N,N'-Methylenbisacrylamid, Nr.29195;

Harnstoff, Nr. 24524 (Fa. Serva, Heidelberg); Bromphenoblau Nr. 1840-901; Xyloolcyanol FF, Nr. 1840-502; Bind-Silan, Nr. 1850-251; Repel-Silan, Nr. 1850-252; Zwischenstücke und Käbme (0,1 mm, 26 Proben), Nr. 2010-402 (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg); M13 Sequenzierungskit, Nr. 4502; (³⁵S)-dATP as (600 Ci/mmol), Nr. SJ 304 (Fa. Amersham, Braunschweig); dATP, Nr. 27-2050; dCTP, Nr. 27-2060; dGTP, Nr. 27-2070; dTTP, Nr. 27-2080; ddATP, Nr. 27-4819; ddCTP, Nr. 27-4823-01; ddGTP, Nr. 27-4817; ddTTP, Nr. 27-4831 (Fa. Pharmacia, Freiburg); DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), Nr. 104 523 (Fa. Boehringer, Mannheim); Unifix Fixierer, Nr. Cat 351 2001; D19 Entwickler, Nr. Cat 502 7065; X-Omat S Film, Nr. Cat 501 3131 (Fa. Kodak, Rochester, USA)

- Hybridoma Techniken

Freund'sches Adjuvans, komplett und inkomplett (Fa. Behring, Marburg); Ether zur Narkose (Fa. Hoechst, Frankfurt); Rosewell Park Memorial Institute-(RPMI)-Medium 1640 (mit NaHCO₃, ohne Glutamin), Nr. 1215; Fötales Kälberserum (FCS), Nr. 0115; Penicillin-Streptomycin (100fach), Nr. 2212; Natrium-Pyruvat 100mM (100fach), Nr. 0473 (Fa. Seromed, Berlin); Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-(HAT)-Konzentrat (50fach), Nr. 644579; Hypoxanthin-Thymidin-(HT)-Konzentrat (50fach), Nr. 623091; L-Glutamin 200 mM (100fach), Nr. 210277, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)) (ABTS), Nr. 102946, D-Biotin-hydroxysuccinimidester, Nr. 732494, Peroxidase (POD) aus Meerrettich, Nr. 108090, (Fa. Boehringer, Mannheim); Polyethylenglykol PEG 4000, Nr. 33236 (Fa. Serva, Heidelberg); Pristan (2,4,6,10-Tetramethylpentadecan), Nr. T 2280-2 (Fa. Aldrich, Steinheim); Myelomzellen X63/AG 8.653 (freundlicherweise von Dr. R. P. Linke zur Verfügung gestellt, Institut f. Immunologie, Universität München); Mehrfachkulturschalen: Cluster 96, Nr. 3596; Cluster 24, Nr. 3524; Cluster 6, Nr. 3506; Zellkulturflaschen: 250 ml, Nr. 3075; 650 ml, Nr. 3150; Serologische Pipetten: 1 ml, Nr. 4001; 5 ml, Nr. 4051; 10 ml, Nr. 4101 (Fa. Tecnomara, Fernwald); Acht-Kanal-Pipette, ELISA-Platten, Typ M 129 B (Fa. Dynatech, Denkendorf); Zellkulturflaschen 50 ml, Nr. 690160 (Fa. Greiner, Nürtingen); Röhrchen, konischer Boden, 50 ml, Nr. 2070 (Fa. Falcon, Heidelberg)

- Mikrobiologische Techniken

Petrischalen 24,5 cm x 24,5 cm, Nr. 166508 (Fa. Nunc, Wiesbaden); Petrischalen (Durchmesser 9 cm), Nr. 82/1.192 (Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf); Nitrocellulose-Membranfilter (Durchmesser 8,2 cm, 0,45 µm Porengröße), Nr. 10401116 (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel); Bacto-Agar, Nr. 0140-01; Bacto-Trypton, Nr. 0123-01; Hefeextract, Nr. 0127-01 (Fa. Difco, Detroit); Pepton aus Casein C/HSF, Nr. 48614 (Fa. Serva, Heidelberg); NZ-Amine A (Casein-Hydrolysat), Nr. 101290 (Fa. ICN, Cleveland, USA); Maltose, Nr. M-5885; Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Nr. 5502; 1-Acetyl-2-phenylhydrazin (APH), Nr. A4626; Hämin, Nr. 2250; Kreatinphosphokinase, Nr. C3755 (Fa. Sigma, Deisenhofen); 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal), Nr. 651745; Ampicillin, Nr. 835242; Chloramphenicol, Nr. 634433 (Fa. Boehringer, Mannheim); Dimethylsulfoxid (DMSO), Nr. 9678; Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure (EGTA), Nr. 8435; 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), Nr. 10110; (Fa. Merck, Darmstadt); Polyethylenglykol (PEG) 6000, Nr. 807491 (Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn); Nuklease aus Staphylococcus aureus, Nr. 4797 (Fa. Worthington, New Jersey); Heparin-Natrium, Nr. 204721/7 (Fa. Braun, Melsungen)

- Molekularbiologische Techniken

M13 mp18, Nr. 27-154701, M13 mp19, Nr. 27-154901 (Fa. LKB-Pharmacia, Freiburg); E. coli Stämme Y1088, Y1089, Y1090, Nr. K1010; Ovalbumin-DNA in Lambda gt 11, Nr. K1004; humane Lambda gt 11 Bank, Nr. HL 1010 (Fa. Clontech, Palo Alto, USA); M13 Klonierungsskit, Nr. 4502 (Fa. Amersham, Braunschweig); Restriktionsendonukleasen: Bam HI, Nr. 567604; Hind III, Nr. 656313; Eco RI, Nr. 200310; Sph I, Nr. 1026950 (Fa. Boehringer, Mannheim); Sst I, Nr. 5222SA (Fa. BRL, Eggenstein); Dialyseschlauch Visking 8/32, Nr. 44104 (Fa. Serva, Heidelberg)

- weitere Substanzen und Materialien

Enlightning^R, Nr. NEF-974, Omnifluor, NEF-906B, Protosol, NEF-935 (Fa. NEN, Dreieich); PD 10 - Säulen, Nr. 17-0851-01 (Fa. LKB-Pharmacia, Freiburg); Oligo dT an Sepharose gekoppelt, Typ 3, Nr. 06-672-0003 (Fa. Paesel, Frankfurt)

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darm-

stadt oder Sigma, Deisenhofen in p.a.-Qualität bezogen. Aqua bidest. wurde über ein Seral Reinstwasser-System gewonnen (Fa. Alhäuser, Ransbach-Baumbach).

Für die DNA-Sequenzanalyse und Homologieuntersuchungen auf DNA- wie auf Proteinebene wurde das Computerprogramm Microgenie^R (Cary Queen & Laurence Korn) der Fa. Beckman, München, verwendet.

Freundlicherweise wurden zur Verfügung gestellt:

Akrosin aus Ebertestes, Anti-Akrosin-Antikörper aus Schaf und Kaninchen, sowie Antiseren gegen die Akrosin-Inhibitoren I und II von Sigrid Sokal; Antikörper gegen CF-Inhibitor und humane IgG von Dr. Hans Hock; Antikörper gegen humanes Albumin und Ki-17-Klon in Lambda gt 11 von Rudolf Vogel; Antiserum gegen β -Galaktosidase von Irene Just; Antiserum gegen Ovalbumin von Martina Haasemann; E. coli Stamm JM 103 und CF-I-Klon in Lambda gt 11 von Dr. Günther Rauth; Oligonukleotide in der Größe von 20 Basen von Josef Kellermann, Max-Planck-Institut, Martinsried.

C. 2. Methoden

Die Prozentangaben sind, falls nicht anders angegeben, als Gewicht/Volumen (w/v) zu verstehen.

C. 2.1. Enzymimmunoassay (Voller, 1980)

Lösungen

A	0,1 M NaCl, 50 mM Benzamidin, 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5
B	0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4
C	2 % Rinderserumalbumin in Lösung B
D	0,1 M Citronensäure, 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 4,5
E	2 % 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6))
F	0,6 % (v/v) H_2O_2

Antigenlösung	0,5 ug/ml in 5 mM Benzamidin, 20 mM Ammoniumformiat, pH 3,5
Substratlösung	9,5 ml Lösung D, 0,5 ml Lösung E, 0,2 ml Lösung F
Konjugatlösung	Peroxidase-gekoppelter Antikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist (1:1000 verdünnt).

Mit Ausnahme der Plattenbeschichtung (4°C) werden Inkubationen bei 37°C durchgeführt. Das Arbeitsvolumen beträgt 200 ul/Kavität; bis auf die Substratlösung werden Lösungen in Puffer C hergestellt; zwischen den Inkubationsschritten werden die Kavitäten jeweils fünfmal mit Puffer B gespült.

C. 2.1.1. Indirekter ELISA

Der indirekte ELISA wird zur Titerbestimmung von Aszites und Zellkulturüberständen, zur Erkennung Antikörper-produzierender Hybridomazellen, zur Beobachtung des Titerverlaufs bei Immunisierungen eingesetzt und, mit einigen Modifikationen, zur Subtypisierung von monoklonalen Antikörpern (siehe D. 1.7.).

Durchführung

Mikrotiterplatten werden mit Antigenlösung (0,5 ug/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Für Titerbestimmungen wird eine serielle Verdünnungsreihe (2^n) des Antikörpers, für die Bestimmung von Hybridomazellen konstant eine 1:2-Verdünnung des Zellüberstands eingesetzt. Die Platten werden mit 1:1000 verdünnter Konjugatlösung beschickt und anschließend mit Substrat inkubiert. Die Inkubationsdauer für die Probe (Erstantikörper) beträgt 2 Stunden, für die Konjugatlösung (Zweitantikörper) 3 Stunden und für Substratreaktion 30 min. Die Farbreaktion wird im Mikro-ELISA-Photometer bei 405 nm vermessen. Die graphische Auswertung erfolgt im halblogarithmischen Maßstab (Abszisse: Logarithmus der Antikörperkonzentration, Ordinate: Extinktion bei 405 nm) oder im sog. Dot-Plot (Hybridomazellkulturen).

C. 2.1.2. Kompetitiver ELISA

Dieser ELISA dient zur Epitopspezifizierung von monoklonalen Antikörpern. Er beruht auf der Konkurrenz von biotinylierten und nicht biotinylierten Antikörpern um eine Antigenbindungs-Stelle (Epitop). Zur Analyse wird die Konzentration des biotinylierten Antikörpers konstant gehalten und die des zweiten unmarkierten Antikörpers in einer seriellen Verdünnungsreihe (2^n) variiert.

Durchführung

Die Titerplatten werden mit 5 µg/ml Antigen über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wird das Gemisch von biotinyliertem und nicht biotinyliertem Antikörper 3 h bei 37°C inkubiert. Es folgen Inkubation mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex und Substratumsetzung; jeweils 30 min bei 37°C.

C. 2.2. Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradienten-Gelen (Laemmli, 1970)

Mit dieser Methode werden Gemische von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur in SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen.

Lösungen

2 x Probenpuffer	4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,25 M Tris-Base, 10 % DTT, ad 10 ml H ₂ O, pH 6,8; Anfärbung mit 10 µl gesättigter wässriger Bromphenolblau-Lösung
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Durchführung

Die in Lösung vorliegenden Proben werden zur Reduktion der Disulfidbrücken mit einem Äquivolumen an Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel appliziert. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur zunächst eine halbe Stunde bei 30 mA (Sammegel) und anschließend 3 h bei 40 mA (Trenngel). Die Proteine werden entweder mittels Silberfärbung (siehe C. 2.2.1.) detektiert oder nach dem Transfer auf Nitrocellulose (siehe C. 2.2.3.) im Immunoprint (siehe C. 2.2.4.) nachgewiesen. Mit ^{35}S markierte Proteine werden mittels der Fluorographietechnik (siehe C. 2.2.2.) detektiert.

C. 2.2.1. Silberfärbung (Oakley et al., 1980)

Lösungen

L1	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.
L2	5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.
L3	10 % (v/v) Glutardialdehyd in aqua bidest.
L4	2,8 ml 25 % (v/v) Ammoniaklösung, 42 ml 0,36 % NaOH, 8 ml 19,4 % Silbernitratlö- sung (tropfenweise zugeben), ad 200 ml aqua bidest.
L5	0,005 % Citronensäure, 0,019 % (v/v) Formaldehyd, ad 200 ml aqua bidest.
L6	5 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Nach der SDS-Elektrophorese wird das Gel wie folgt inkubiert:

Lösung	Volumen (ml)	Zeit (min)
L1	200	30
L2	200	30
L3	200	30
aqua bidest.	je 200	6 x 10

L4	200	15
aqua bidest.	je 200	4 x 2
L5	200	ca. 1
L6	200	30

C. 2.2.2. Fluorographie (nach Chamberlain, 1979)

Diese Technik dient zur Detektion von mit schwachen β -Strahlern markiertem Protein. Als Marker wird ^{35}S -Methionin verwendet, das durch zellfreie Proteinbiosynthese in die entstehenden Proteine inkorporiert wird. Der Größenstandard ist mit dem β -Strahler ^{14}C markiert.

Lösungen

Lösung A	10 % TCA, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol
Lösung B	Enlightning ^R

Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Gel zur Denaturierung der Proteine 150 min in Lösung A und dann 30 min in Lösung B inkubiert. Danach wird es über Whatman 3 MM Filterpapier gelegt, getrocknet und mit einem Röntgenfilm bei -70°C ein bis drei Tage exponiert.

C. 2.2.3. Western-Blotting, (Semidry-Methode nach Kyhse-Andersen, 1984)

Lösungen

L1	20 % (v/v) Methanol, 300 mM Tris/Cl, pH 10,4
L2	20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris/Cl, pH 10,4
L3	40 mM ϵ -Aminocaprinsäure, 20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris/Cl, pH 9,4

Durchführung

Nach der SDS-Gelelektrophorese werden 6 Lagen Whatman 1-Filterpapier, mit Lösung L1 befeuchtet, luftblasenfrei auf die Anode (Graphitplatte) gelegt; darüber kommen 3 Lagen mit L2 getränkte Filter, dann die Nitrozellulose, das SDS-Gel und schließlich 9 Lagen Filterpapier, das mit L3 angefeuchtet ist. Eine Graphitplatte, die als Kathode dient, wird oben aufgelegt. Der Transfer wird 90 Minuten bei einer Stromstärke von 100 mA durchgeführt.

C. 2.2.4. Immunoprint (Hsu & Fanger, 1981)

Das Immunoprint-Verfahren dient zur Detektion von Proteinen, die entweder durch Western-Blotting oder Plaque-Lifting auf Nitrozellulose-Filter transferiert werden. Die Antikörperlösungen, in Puffer B hergestellt, werden ausnahmslos bei Raumtemperatur inkubiert. Als Waschlösung zwischen den Inkubationsschritten dient ebenfalls Puffer B.

Lösungen

A	200 mM NaCl, 50 mM Tris/Cl, pH 8,0
B	0.1 % (v/v) Tween 20 in Lösung A
C	0,1 % (v/v) Tween 20, 3 % Rinderserumalbumin in Lösung A
D	17 mM 4-Chlor-1-Naphthol in Methanol
Substratlösung	5 ml Lösung D, 500 μ l 0,6 % (v/v) H_2O_2 , 24,5 ml Lösung A

Durchführung

Nach dem Blot bzw. der IPTG-Induktion werden die Filter dreimal kurz mit Lösung B und einmal 15 min mit Lösung C gewaschen. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgt über Nacht, die des biotinylierten Zweitantikörpers 1 h. Dann wird der Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex für 20 min inkubiert und schließlich die Substratreaktion ausgeführt.

C. 2.3. **Plaque-Immundetektion (Young & Davis, 1983)**

Der Infektion von Bakterien mit Phagen geht eine Absorptionsphase (20 min bei 37°C) voraus. Danach wird der Ansatz mit Top-Agarose gemischt und auf den entsprechenden Platten (Petrischalen mit Agar und Nährstoffen) ausgegossen.

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium (ca. 20 ml pro kleine Petrischale)
LB-Top-Agarose	0,7 % Agarose in LB-Medium (3 ml pro Platte, auf 50°C vorgewärmt)
10 mM MgSO ₄	
10 mM IPTG	
E.coli-Stamm Y1090, r ⁻ ,	200 µl MgSO ₄ -Suspension (siehe C.2.9.1.)
Rekombinanter Phage Lambda gt11,	10 µl TM-Suspension (Titer ca. 10 ⁶ pfu/ml) (siehe C.2.9.2.)

Durchführung

Die Platten werden mit der Agarseite nach oben bei 42°C inkubiert, bis die ersten Plaques sichtbar werden. Dann wird ein Nitrozellulose-Membran-Filter mit 10 mM IPTG-Lösung getränkt, kurz getrocknet und blasenfrei auf die Platten gelegt. Nach 3 stündiger Inkubation bei 37°C werden die Filter abgezogen und weiterbehandelt wie bei der Immundetektion (siehe C. 2.2.4.) beschrieben.

C. 2.4. **Native Agarose Gele (Maniatis et al., 1982)**

Diese Gele dienen zur Analyse von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA.

Lösungen

TBE-Puffer	60 mM Tris, 60 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,2 - 8,4
------------	---

Auftragspuffer 0,25 % Bromphenolblau, 50 % Sucrose in TBE

Durchführung

Es werden 0,5 %, 1 %, oder 2 % Agarose-Gele in TBE-Puffer hergestellt - inkl. Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml). Die Proben werden in Auftragspuffer (entsprechend 1/10 ihres Volumens) aufgenommen und 10 Minuten bei 70°C inkubiert; danach werden sie rasch im Eisbad abgekühlt und auf das Agarose Gel appliziert. Die Elektrophorese wird bei 90 V und Raumtemperatur durchgeführt.

C. 2.5. Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Lösungen

A-Mix	0,125 mM dCTP, 0,125 mM dGTP, 0,125 mM dTTP, 0,075 mM ddATP, 0,05 mM EDTA, 5 mM Tris/Cl, pH 7,5
C-Mix	0,004 mM dCTP, 0,08 mM dGTP, 0,08 mM dTTP, 0,01 dCTP, 0,05 mM EDTA, 5 mM Tris/Cl pH 7,5
G-Mix	0,08 mM dCTP, 0,004 mM dGTP, 0,08 mM dTTP, 0,025 mM ddGTP, 0,05 mM EDTA, 5 mM Tris/Cl pH 7,5
T-Mix	0,08 mM dCTP, 0,08 mM dGTP, 0,004 mM dTTP, 0,025 mM ddTTP, 0,05 mM EDTA, 5 mM Tris/Cl pH 7,5
Chase-Mix	0,125 mM dATP, 0,125 mM dCTP, 0,125 mM dGTP, 0,125 mM dTTP, 5 mM Tris/Cl pH 7,5
Farb-Mix	10 mg Xylen-Cyanol, 10 mg Bromphenolblau, 20 mM EDTA in 10 ml Formamid (mit Amberlite TM MB 1 entionisiert)
Klenow-Puffer (10x)	500 mM NaCl, 70 mM MgCl ₂ , 70 mM Tris/Cl, pH 7,4
Laufpuffer	60 mM Tris, 60 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,2
Gellösung	7 M Harnstoff, 5,71 % Acrylamid, 0,29 % Bisacrylamid, 0,08 % Ammoniumpersulfat, 0,05 % (v/v) TEMED in Laufpuffer

C. 2.5.1. Herstellung des Sequenzgels (Garoff & Ansorge, 1981)

Die Auftrennung der DNA-Fragmente aus der Sequenzierungsreaktion erfolgt in keilförmigen Harnstoff-Acrylamid-Gelen (Dicke: 0,1 bis 0,4 mm, Breite: 21 cm, Länge: 53 cm). Die Gelapparatur besteht aus einer thermostatisierbaren Grundplatte und einer Deckplatte. Die Deckplatte wird mit Bind-Silan und die Thermostatplatte mit Repel-Silan beschichtet, um das Ablösen des Gels von der Thermostatplatte für die Autoradiographie zu ermöglichen. Der Stufengradient wird durch Spacer unterschiedlicher Länge gewährleistet, die am Rand der Thermostatplatte aufliegen. Zur Herstellung des Gels wird die Deckplatte über die Thermostatplatte geschoben, während die Gellösung von oben her gegossen wird. Anschließend werden beide Platten mit Klammern fixiert. Der Kamm spart 26 Taschen aus, sodaß pro Gellauf max. sechs Ansätze mit je vier Reaktionsgemischen untersucht werden können.

C. 2.5.2. Hybridisierungsreaktion (Strauss et al., 1981)

Zur Hybridisierung werden 5 ul einzelsträngiger M13 DNA (200 bis 300 ng), 1 ul (2,5 ng) M13 Universal Primer oder 1 ul eines geeigneten Oligonukleotids (3 - 8 ng, 20mer, unge-reinigt), 1,5 ul 10 x TE-Puffer und 2,5 ul H₂O gemischt. Nach zweistündiger Inkubation bei 65°C wird innerhalb 4 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses Gemisch kann entweder gleich anschließend oder einen Tag später zur Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden, wenn es über Nacht bei -20°C gelagert wird.

C. 2.5.3. Polymerasereaktion

Der Hybridisierungsmischung (siehe C. 2.5.2.) werden 1 ul (1 U/ul) Klenow Enzym und 3 ul ³⁵S dATP (24 uCi) zugefügt. Davon werden jeweils 2,5 ul zu je 2 ul der Nukleotid-Gemische (A-Mix, C-Mix, G-Mix, T-Mix) pipettiert. Die Reaktion wird 20 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Zugabe von 2 ul Chase-Mix wird weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert, dann

wird die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l Farb-Mix und dreiminütiger Inkubation bei 95°C gestoppt. Bis zur Applikation auf das Sequenzgel werden die Proben auf Eis gelagert; längere Lagerung erfolgt bei -70°C (max. drei Tage).

C. 2.5.4. Gelelektrophorese

Zur Entfernung störender Ladungsträger wird ein Vorlauf von 30 Minuten bei 1500 V durchgeführt. Vor dem Applizieren der Proben (ca. 1 μ l pro Tasche) werden die Taschen ausgespült, um herausdiffundierenden Harnstoff zu entfernen (Restmengen von Harnstoff in den Geldaschen verhindern, daß die Proben scharfe Lauflinien bilden). Anschließend wird die Elektrophorese bei 2500 V und 50°C durchgeführt. Die Dauer des Laufes beträgt im allgemeinen 3 h, kann aber - abhängig vom interessierenden Sequenzbereich - auf 1 h verkürzt, bzw. bis zu 8 h verlängert werden. Die Deckplatte inkl. Gel wird von der Thermostatplatte entfernt und 10 Minuten zur DNA-Fixierung in 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert. Der Harnstoff wird durch intensives Waschen mit Wasser entfernt und das Gel schließlich mit einem Heißluftgebläse getrocknet. Zur Autoradiographie wird ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und 1 bis 2 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln exponiert.

C. 2.6. Proteinchemische Methoden

C. 2.6.1. Kopplung von Immunglobulinen an CNBr-aktivierte Sepharose (Axen et al., 1967)

Lösungen

Waschlösung	1 mM HCl
Kopplungspuffer	0,1 M Trinatriumcitrat, pH 6,5
Terminationspuffer	1 M Ethanolamin, pH 8,0
Waschpuffer D	0,1 NaOAc, 1 M NaCl, pH 4,0
Waschpuffer E	0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 1 M NaCl, pH 8,0
Durchführung	

200 mg CNBr-Sephrose werden mit Waschlösung gewaschen und mit Kopplungspuffer auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Dann werden die immunselektierten und gegen den Kopplungspuffer dialysierten Antikörper (Proteinkonzentration 15 mg/ml) mit der Sephrose unter End-über-End-Rotation 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Stunden wird mit Kopplungspuffer gewaschen, das Gel in 4 ml Terminationspuffer aufgenommen und nochmals zwei Stunden wie oben inkubiert. Anschließend wird abwechselnd mit Waschpuffer D bzw E (jeweils fünfmal) gewaschen, bevor das Gel in Puffer E inkl. 3 mM Natriumazid bei 4°C gelagert wird.

C. 2.6.2. Immunselektion (Müller-Esterl, 1986)

Lösungen

PBS-Puffer	150 mM NaCl, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2
NaSCN-Puffer	200 mM NaSCN, pH 5,8
Glyzin-Puffer	200 mM Glyzin, pH 2,2
HEPES-Puffer	1 M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure, pH 7,5

Durchführung

Die Immunaффinitätschromatographie erfolgt an immobilisiertem Diisofluoropropyl-inaktiviertem Akrosin, das, wie für Immunglobuline unter C. 2.6.1. beschrieben, an CNBr-aktivierte Sephrose gekoppelt wird. Es werden 20 ml Antiserum über Nacht an der Akrosin-Sephrose rezykliert (Flußgeschwindigkeit 15 ml/h). Nacheinander werden zunächst ungebundene Proteine mit PBS-Puffer und anschließend schwach gebundene Proteine mit NaSCN-Puffer von der Säule eluiert. Die Säule wird wieder mit PBS-Puffer gewaschen, bevor die spezifisch gebundenen Antikörper mit Glyzin-Puffer eluiert werden. Dabei werden Fraktionen à 6 ml aufgefangen, in denen 1,5 ml HEPES-Puffer zur Neutralisation vorgelegt wird. Sämtliche Arbeitsschritte werden bei 4°C ausgeführt.

C. 2.6.3. Vakuumdialyse

Ein in Wasser vorgequollener Dialyseschlauch wird zwischen einen Trichter und einem durchbohrten Gummistopfen in eine Saugflasche eingespannt. Die verdünnte IgG-Lösung wird luftblasenfrei in den Dialyseschlauch eingefüllt und mittels Wasserstrahlvakuums konzentriert (das Wasser tritt aus dem Dialyseschlauch aus, während das Protein zurückgehalten wird). Die Dialyse erfolgt im allgemeinen über Nacht bei 4°C. Danach wird die Lösung kurz zentrifugiert (5 min, 12000 x g) und die Antikörper-Konzentration des Überstands durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

C. 2.6.4. Ammonsulfatfällung

Lösungen

Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung 100 %

Durchführung

Der Überstand aus Hybridomazellkulturen bzw. der Aszites wird mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung auf 45 % Endkonzentration an Ammoniumsulfat eingestellt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C wird 30 Sekunden bei 12000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Niederschlag, der die gewünschten Immunglobuline enthält, kann nach Aufnahme in einem entsprechenden Puffer direkt für den ELISA, Plaque-lift-Test oder die Biotinylierung (C. 2.6.5.) eingesetzt werden.

C. 2.6.5. Biotinylierung von Immunglobulinen (Subba et al., 1983)

Lösungen

Lösung A 100 mM NaHCO₃, pH 8,0

Lösung B 1 mg/ml D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester
in Dimethylsulfoxid

Lösung C

100 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

Durchführung

Der zu biotinylierende Antikörper wird aus Tumorflüssigkeit über Ammoniumsulfatfällung angereichert (C. 2.6.4.). Nach Aufnahme des Niederschlages in Lösung A (finale Konzentration 1 mg/ml) werden pro 1 mg IgG 100 ul Lösung B zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 16 h gegen Lösung C (mit dreimaligem Pufferwechsel) dialysiert. Nach der Dialyse wird kurz zentrifugiert und die Konzentration des Überstandes photometrisch bei 280 nm bestimmt. Biotinyliertes IgG wird portioniert bei -20°C gelagert. Die Optimierung der Antigenbeschichtung und des biotinylierten Zweitantikörpers erfolgt mit Hilfe eines indirekten ELISAs. Der biotinylierte Antikörper wird in seiner optimalen Konzentration zur Epitopkartierung im kompetitiven ELISA eingesetzt.

C. 2.6.6. ¹²⁵I-Markierung, (Fraker & Speck, 1978)

Iodierungsreagenz 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-diphenylglycoluril

Elutionspuffer 0,1 M NaOAc, 0,1 M NaCl, 0,1 % Brij, pH 5,5

Durchführung

5 ug Akrosin in 20 ul Elutionspuffer werden in einem mit Iodierungsreagenz beschichteten Plastikröhrchen mit 0,125 mCi Na¹²⁵I fünf Minuten inkubiert. Freies Jod wird über eine, zuvor mit Elutionspuffer äquilibrierte PD-10 Säule abgetrennt. Die spezifische Aktivität des iodierten Proteins (uCi/ug) wird mittels Gamma-Counter bestimmt.

C. 2.7. Immunologische Methoden

C. 2.7.1. Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler & Milstein, 1975)

Medien:

RPMI	RPMI 1640 Medium, mit NaHCO_3 (2,2 g/l)
RPMI/10 % FCS	RPMI, Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 E/100 ug/ml), 10 % FCS (finale Konzentrationen)
HT-Medium	RPMI/20 % FCS, Hypoxanthin (13,6 mg/l), Thymidin (3,9 mg/l) (finale Konzentrationen)
HAT-Medium	HT-Medium mit Aminopterin (0,18 mg/l)
50 % PEG-Lösung	50 % PEG 4000 in RPMI

C. 2.7.2. Immunisierung

Es werden weibliche BALB/c Mäuse, die in der Regel 6-12 Wochen alt sind, verwendet. Die Grundimmunisierung erfolgt subkutan, mit 50 ug Antigen emulgiert in 200 ul 50 % (v/v) kompletten Freund'schem Adjuvans. Am 28. Tag nach der Grundimmunisierung werden 30 ug, am 56. Tag 10 ug Antigen in 200 ul 50 % inkomplettem Freund'schem Adjuvans subkutan injiziert. 12 Tage nach der zweiten Injektion wird zur Titerbestimmung mit einem indirekten ELISA eine Probeblutung aus dem orbitalen Venenplexus abgenommen. Die Immunisierung wird schließlich für vier Wochen unterbrochen. Vier Tage vor der Fusion werden 100 ug Antigen in isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert.

C. 2.7.3. Myelomzellen

Als Fusionszelllinie für die Maus-Lymphozyten werden Myelomzellen des Typs X63/AG 8.653 (non-producer, aus BALB/c) verwendet. Eine Woche vor der Fusion werden die Zellen

aufgetaut, in RPMI/10 % FCS vermehrt und auf eine Zelldichte von ca 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Für eine Fusion werden auf ca. 10^8 Lymphozyten 5×10^7 Myelomazellen eingesetzt.

C. 2.7.4. Gewinnung von Makrophagen

Zur Gewinnung von Makrophagen können Mäuse unabhängig von Geschlecht und Alter verwendet werden. Die Mäuse werden narkotisiert und durch zervikale Dislokation geopfert. Dann wird die Peritonealkavität mit 10 ml RPMI gespült, die so gewonnenen Zellen abzentrifugiert, im gewünschten Medium resuspendiert und auf den Kulturplatten ausgesät (ca. 2×10^4 Makrophagen pro 200 μ l Medium).

C. 2.7.5. Zellfusion (Galfre & Milstein, 1981)

Die immunisierte Maus wird narkotisiert, das Hyperimmunserum durch die Augenvenen entnommen und die Maus mittels zervikaler Dislokation geopfert. Zur Isolierung der in ihr enthaltenen Lymphozyten (ca. 10^8 pro Organ) wird die Milz aseptisch entfernt und zerkleinert. Die Lymphozyten werden mit der entsprechenden Anzahl Myelomazellen vermischt und anschließend pelletiert. Innerhalb einer Minute werden 0,5 ml PEG-Lösung zugetropft und anschließend 90 Sekunden bei 37°C inkubiert. Während der nächsten fünf Minuten werden schrittweise 7,5 ml RPMI zugegeben. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 25°C wird die Zellsuspension abzentrifugiert, die sedimentierten Zellen in HAT-Medium aufgenommen und auf drei Zellkulturplatten (mit je 96 Kavitäten) ausgesät, auf denen 2×10^4 Makrophagen vorgelegt waren. Die Zellen werden bei 37°C und 5 % CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Am 3. und 7. Tag werden 100 bzw. 150 μ l HAT-Medium ausgetauscht. Am 10. und 13. Tag werden 200 μ l HAT- durch HT-Medium und am 16. Tag 100 μ l HT-Medium durch RPMI/10 % FCS ersetzt. Ab dem 16. Tag erfolgt der Medienwechsel nach Bedarf, i.a. alle 2 - 3 Tage. Die nächsten 4 - 6 Wochen werden die Überstände im indirekten ELISA auf Antikörperproduktion getestet.

C. 2.7.6. Subklonierung

Im ELISA positiv reagierende Zellen werden bei konfluentem Wachstum auf größere Kulturplatten (mit 24 Kavitäten) überführt. Bei ausreichend hoher Zellzahl (ca $2-8 \times 10^5$ /ml) kann nach der Methode der limitierenden Verdünnung subkloniert werden. Dazu wird die Zelldichte so eingestellt, daß statistisch nur jede zweite Kavität einen Zellklon erhält (ca. 50 Zellen pro 96 Kavitäten). Diese Prozedur erfolgt dreimal, um die Klonalität der Zellen zu gewährleisten.

C. 2.7.7. Aszitesproduktion

Für die Aszitesproduktion werden mindestens drei Monate alte, weibliche BALB/c-Mäuse mit 0,5ml Pristan, einem Co-Karzinogen, i.p. behandelt. Ein bis drei Wochen danach werden diesen Tieren ca. 10^7 Zellen einer den gewünschten Antikörper produzierenden Hybridoma-Zelllinie injiziert. Die Tiere entwickeln innerhalb ca. einer Woche ein Plasmozytom mit Aszitesflüssigkeit, die bis zum Exitus der Maus alle 2 bis 3 Tage durch Punktion der Peritonealkavität gewonnen werden kann.

C. 2.8. Gentechnologische Methoden

Für Arbeiten mit DNA und RNA wird immer doppelt destilliertes und autoklaviertes H_2O verwendet.

C. 2.8.1. RNA-Gewinnung (Chirgwin et al., 1979)

Lösungen:

Guanidinthiocyanatlösung

4 M Guanidinthiocyanat, 0,7 mM Laurylsarcosin, 1 M Natriumcitrat, 0,1 M Mercaptoethanol, pH 7,0

Guanidinhydro-
chloridlösung 7,5 M Guanidinhydrochlorid, 25 mM Natrium-
 citrat, 5 mM DTT, pH 7,0

0,5 M DTT

1 M Essigsäure

1 M Natriumacetat, pH 7

2 M Kaliumacetat, pH 5

Durchführung

12 g gefrorenes Testesgewebe werden grob zerkleinert und unter N_2 im Mörser pulverisiert. Das Gewebepulver wird in 192 ml Guanidinthiocyanatlösung suspendiert und bei 4°C 90 Sekunden lang mit einem Mixer homogenisiert. Aus dem Überstand des Homogenats wird die RNA durch dreimalige Fällung (2,5 % (v/v) Essigsäure und 75 % (v/v) Ethanol) und dreimaliges Aufnehmen im jeweils halben Volumen Guanidinhydrochloridlösung von der DNA abgetrennt. Nach der letzten Fällung wird der RNA-Niederschlag in 0,2 mM Kaliumacetat aufgenommen und mit doppeltem Volumen Ethanol gefällt. Der Niederschlag wird in H_2O aufgenommen, und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Die Qualität der Präparation zeigt sich im Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm (Idealwert 2,1) bzw. 260 und 235 nm (Idealwert 2,0).

C. 2.8.2. Oligo dT-Säulenchromatographie (Aviv & Lederer, 1972)

Lösungen:

0,01 M Natriumazid

0,1 M Natriumhydroxid

1,25 M Lithiumchlorid

0,5 M Lithiumchlorid

0,1 M Lithiumchlorid

oligo dT-Sepharose

TE-Puffer 10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Waschpuffer 10 mM Tris/Cl, 0,1 mM LiCl, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,5

Elutionspuffer 10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5

Probenpuffer 10 mM Tris/Cl, 0,5 mM LiCl, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,5

Durchführung

In H₂O vorgequollene oligo dT-Sepharose (300 mg/5 ml) wird in eine Pasteurpipette eingefüllt, deren unteres Ende mit Glaswolle abgedichtet ist. Das Säulenmaterial wird mit 0,1 M NaOH gewaschen, mit Wasser neutralisiert und mit 0,5 M LiCl äquilibriert. Dann wird die in Probenpuffer gelöste Gesamt-RNA (1 mg/5 ml) nach zweiminütigem Denaturieren durch Erhitzen auf 60°C über die Säule gegeben. Der Durchlauf wird gesammelt und erneut chromatographiert. Anschließend wird die an das Säulenmaterial gebundene polyA⁺ RNA mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Das Säulenmaterial wird regeneriert (siehe oben), die RNA-haltigen Fraktionen auf 0,5 M (Endkonzentration) LiCl eingestellt und die Chromatographie, wie oben beschrieben, ein zweites Mal durchgeführt. Die Konzentration wird durch Absorptionmessung bei 260 nm bestimmt.

C. 2.8.3. Herstellung von Retikulozytenlysats (Pelham & Jackson, 1976)

Lösungen:

Suspensionspuffer 0,134 M NaCl, 5 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂, 5 mM Glucosemonohydrat, 5 mM HEPES, pH 7,5

Elutionspuffer 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 25 mM DTT, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,5

0,5 % Kreatininphosphokinase

0,1 % Nuclease aus Staphylococcus aureus

0,1 M CaCl₂

0,2 M EGTA

10 mM Hämin

1,25 % 1-Acetyl-2-phenylhydrazin

Heparin

Lösen von Häm-in

Lösungen

Häm-in

1 N NaOH

1 N HCl

1 M Tris/Cl, pH 7,5

Glyzerin

0,05 M KCN

Durchführung

Häm-in (65,2 mg) wird in 500 μ l 1 N NaOH gelöst. Dazu werden 500 μ l 1 M Tris/Cl, pH 7,5, und 8 ml Glyzerin gegeben. Mit 1 N HCl wird dann pH 8,2 eingestellt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 ml (10 mM Endkonzentration von Häm-in) aufgefüllt. Die Konzentration wird in KCN-Lösung durch Extinktionsmessung bei 540 nm kontrolliert ($E_{540 \text{ nm}}$ einer 1 mM Häm-in-Lösung ist 11,1).

C. 2.8.3.1. Anämisierung von Kaninchen

An drei hintereinander folgenden Tagen wird einem Kaninchen 1-Acetyl-2-phenylhydrazin injiziert. Ab dem Zeitpunkt der ersten Injektion wird der Hämatokritwert täglich bestimmt, der zunächst kontinuierlich abnimmt und ab dem 7. Tag wieder ansteigt. Jetzt werden die Retikulozyten gezählt.

Liegt ihr Anteil bei 50 bis 60 % der Gesamtzahl der Erythrozyten, wird das Kaninchen entblutet. Dazu werden dem Kaninchen i.v. 2000 U Heparin verabreicht, bevor es kardial punktiert wird. In einem eisgekühltem Becherglas wird das Blut aufgefangen und 10 Minuten bei 0°C und 2600 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen im gleichen Volumen an Suspensionspuffer aufgenommen, worauf erneut zentrifugiert wird. Dieser Waschschrift wird insgesamt viermal durchgeführt. Danach wird das Pellet mit dem 1,5 fachen Volumen an eiskaltem H₂O versetzt, gut durchmischt und 20 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird durch ein feines, steriles Nylonnetz filtriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

C. 2.8.3.2. Gelfiltration des Retikulozytenlysats

Nukleasemischung 7,5 ml Retikulozytenlysats, 7,5 μ l 0,1 M CaCl_2 , 45 μ l 10 mM Häm-in, 161 μ l (5 mg/ml) Kreatininphosphokinase, 105 μ l (1 mg/ml) Nuclease

Durchführung

Zur Entfernung der endogenen Nukleinsäuren (vor allem Hämoglobin-mRNA) wird das Retikulozytenlysats mit der Nuklease-Mischung 20 min bei 25°C inkubiert. Die Nuklease ist Ca^{++} -abhängig; deshalb kann sie durch Zugabe von 75 μ l 0,2 M EGTA gestoppt werden.

Das Säulenmaterial (Sepharose G 50) wird vorgequollen (4 g in 35 ml Elutionspuffer), entgast und autoklaviert. Unspezifische Bindungsstellen werden mit Retikulozytenlysats abgesättigt, die Säule mit 100 ml Elutionspuffer gewaschen und das behandelte Lysats schließlich bei 4°C über die Säule fraktioniert. Das Elutionsdiagramm zeigt im allgemeinen zwei Peaks, von denen der erste die translationsaktiven Fraktionen enthält.

C. 2.8.4. Zellfreie Proteinbiosynthese (Jackson & Hunt, 1983)

Reaktionsansätze

Energiemischung 500 μ l 0,3 M Kreatininphosphat, 500 μ l 20 mM ATP, 4 mM GTP, 230 μ l 0,1 M Glucose, 100 μ l 1 M HEPES, pH 7,5, 375 μ l 2 M Kaliumchlorid, 125 μ l 2 M Kaliumacetat, 160 μ l 75 mM Magnesiumacetat, 10 μ l 0,5 % Phenolrot in 10 mM HEPES, pH 7,5

Aminosäuremix Je 1 mM Alanin, Asparagin, Aspartat, Arginin, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glyzin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin in 10 mM HEPES, pH 7,5.

Translationsmischung

50 ul Energiemischung, 100 ul Retikulozytenlysat, 50 ul RNA-Lösung (0,2 ug/ul), 25 ul ^{35}S -Methionin, 25 ul Aminosäuremix, 2,5 ul 30 mM Spermidin, 2,5 ul 0,4 M DTT

Durchführung

Die Translationsmischung wird 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Zur Doppelwertbestimmung werden zweimal 2 ul Proben auf Whatmanfilter in 200 ml 10 % TCA-Lösung denaturiert. Die Filter werden zweimal mit kalter, einmal mit 100°C heißer, und wieder zweimal mit kalter 10 % TCA-Lösung gewaschen, bevor sie zur Szintillisationszählung mit Protosol und Omnifluor inkubiert werden.

C. 2.8.5. Immunpräzipitation (Anderson & Blobel, 1983)

Lösungen

Stop-Puffer	250 mM Tris/Cl, pH 7,7, 750 mM NaCl, 10 % Triton X-100, 20 mM Methionin
TNET-Puffer	20 mM Tris/Cl, pH 7,6, 140 mM NaCl, 5 mM Na_2EDTA , 1 % Triton X-100, 2 mM Methionin
Phosphatpuffer	0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 7,5
Aprotinin	40 mg/ml H_2O
20 % SDS	
0,5 M Benzamidin	

Durchführung

100 ul des Translationsansatzes werden mit 20 ul Stop-Puffer, 20 ul Benzamidin und 10 ul Trasylol versetzt. Nach Mischen und Zugabe von 35 ul SDS wird erneut gemischt und zwei Minuten bei 100°C inkubiert. Dann wird mit 4 ml TNET-Puffer verdünnt und im Eisbad abgekühlt. Mit immobilisiertem Antikörper oder einem Gemisch aus Antikörper und Protein A-Sepharose wird diese Suspension 16 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Pellet wird viermal mit TNET- und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen

(1 ml pro Waschschrift und Puffer). Dann wird es in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer (siehe C. 2.2.) 10 Minuten bei 100°C inkubiert, bevor der Überstand auf einem SDS-Gel untersucht wird.

C. 2.9. Mikrobiologische Arbeiten

C. 2.9.1. Zellkulturen (Davis et al., 1986)

Genotyp der Stämme

Y1088	E.coli, lacU169, supE, supF, hsdR ⁻ , hsdM ⁺ , metB, trpR, tonA21, proC::Tn5, (pMC9)
Y1089	E.coli, lacU169, proA ⁺ , lon, araD139, strA, hflA, chr::Tn10
Y1090	E.coli, lacU169, proA ⁺ , lon, ara, D139, strA, sup F, (trpC22::Tn10), (pMC9)
Y1090, r ⁻	Y1090, hsdR ⁻ , hsdM ⁺
JM 103	E.coli, (lac pro), thi, strA, supE, endA sbcB, hsdR ⁻ , F'traD36, ProAB, lacI ^q , Z M15

Alle Stämme werden in 7 % Dimethylsulfoxid, 10 mM MgSO₄-Dauerkultur bei -70°C gehalten.

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium (ca. 20 ml pro kleine Petrischale)
LB-Maltose	0,2 % Maltose in LB-Medium
LB/Amp-Agar	1,5 % Agar, Ampicillin 50 mg/ml LB-Medium
10 x M9 Salze	423 mM Na ₂ HPO ₄ , 221 mM KH ₂ PO ₄ , 189 mM NH ₄ Cl, 86 mM NaCl
Minimal-Agar	15 g/l Agar, 1 x M9 Salze, 1 mM MgSO ₄ , 0,1 mM CaCl ₂ , 1 mM Thiamin-HCl, 0,2 % Glucose
2 x TY-Medium	16 g Bacto Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 1 l H ₂ O

Durchführung

Die Stämme Y1088 und Y1090 werden aus den Dauerkulturen auf LB/Amp-Agar vereinzelt, Y1089 auf LB-Agar und JM 103 auf Minimal-Agar. Die Inkubation aller Stämme erfolgt über Nacht bei 37°C. Eine einzelne Kolonie wird isoliert und für die Y-Stämme in 10 ml LB-Maltose-, für JM 103 in 10 ml 2 x TY-Medium einkubiert (Übernachtskultur). Die Y-Stämme werden durch Zentrifugation gesammelt und in 30 ml 10 mM MgSO₄ aufgenommen. Die Flüssigkulturen werden immer frisch angelegt; die Plattenkulturen lagern eine Woche lang bei 4°C.

C. 2.9.2. Amplifikation von Genbanken und Phagenklonen (Davis et al., 1986)

Das Ziel ist, Phagenlösungen mit möglichst hohem Titer zu erhalten. Je höher der Titer ist, desto geringer ist der Titerabfall im Lauf der Zeit.

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium (ca. 20 ml pro kleine Petrischale)
LB-Soft-Agarose	0,5 % Agarose in LB-Medium
TM-Puffer	10 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,5
10 mM MgSO ₄	
E.coli-Stamm Y1088,	200 µl MgSO ₄ -Suspension (OD _{578nm} ca. 2.0)
Lambda gt11-Bank oder -Klon,	10 µl Phagensuspension (min. 10 ⁷ pfu/ml)

Durchführung

Die Präabsorption und das Ausplattieren erfolgt wie unter C. 2.3. beschrieben, bei 37°C bis zur konfluenten Lyse. Anschließend wird die Topagarose pro Platte mit 3 ml TM-Puffer und 30 µl CHCl₃ abgeschwemmt und kurz bei 37°C inkubiert. Aus dieser Suspension werden durch Zentrifugation sorgfältig Agarose und Bakterien entfernt. Im Überstand sind Phagen in der Konzentration von ca. 10¹⁰ pfu/ml.

C. 2.9.3. Isolierung von Lambda-DNA im analytischen Maßstab (Chung et al., 1983)

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Top-Agarose	0,7 % Agarose in LB-Medium (3 ml pro Platte, auf 50°C vorgewärmt)
NZ-Medium	1 % NZ-Kasamino-Säuren, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Kasamino-säuren, 0,2 % $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 7,5
NZ-Agarose	1,2 % Agarose in NZ-Medium, ca. 20 ml pro Petrischale und drei Platten pro Klon
TE-Puffer	10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TM-Puffer	50 mM Tris/Cl, 10 mM MgSO_4 , pH 7,5
PEG-Puffer	2 M NaCl, 20 % Polyethylenglykol in TM-Puffer
Hochsalz (1x)	5 mM Tris/Cl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM DTT, 10 mM NaCl, pH 7,5;
DNase I-Lösung	1 mg/ml 0,1 M MgCl_2
Phenollösung	mit TE-Puffer gesättigtes Phenol
E.coli Stamm Y1090,	200 μl MgSO_4 -Suspension ($\text{OD}_{578\text{nm}}$ ca. 2,0)
Amplifizierter Lambda gt 11-Klon,	20 μl TM-Suspension (ca. 10^5 pfu)

Durchführung

Die Präabsorption und das Ausplattieren erfolgt wie unter C. 2.3. beschrieben. Die NZ-Platten werden mit der Agar-Fläche nach unten bei 42°C bis zur konfluenten Lyse inkubiert (in der Regel 6 h). Dann wird die Topagarose mit TM-Puffer (4 ml/Platte) abgeschwemmt, die Agarose-Puffer-Suspension (12 ml) eines Klons vereinigt und mit 120 μl CHCl_3 versetzt. Nach sorgfältiger Abtrennung von Agarose und Zelldebris werden die Phagen durch Zugabe von 6 ml PEG-Puffer über Nacht bei 4°C gefällt. Unlösliche Verunreinigungen werden durch Aufnehmen des Phagenpellets in 0,5 ml TM-Puffer abgetrennt. Die chromosomale E.coli-DNA wird durch Zugabe von 10 μl DNase I-Lösung und einstündiger Inkubation bei 37°C zerstört. Durch Phenolbehandlung (Ausschütteln mit

gleichen Volumina an Phenol- CHCl_3 bzw. CHCl_3) werden die Phagenköpfe aufgebrochen und die DNA freigesetzt, die anschließend mit Ethanol/0,3 M (Endkonzentration) NaOAc ausgefällt wird. Reste des Phagenproteins werden durch selektive NH_4OAc -Fällung (0,12 g Festsubstanz auf 500 μl TE-Puffer) von der Phagen-DNA getrennt (Inkubation 15 min auf Eis). Anschliessend wird die DNA durch Zugabe des dreifachen Volumens an absolutem Ethanol und fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis erhalten. Die so gewonnene DNA wird zur Analyse eingesetzt: Das Ethanol-Pellet wird in Hochsalz-Puffer aufgenommen und nach Inkubation mit den Enzymen Eco RI und RNase I auf 1 % Agarose Gelen analysiert. Zur Umklonierung in den Sequenzierungsvektor M13 wie auch zur Restriktionskartierung werden größere Mengen an DNA benötigt. In diesem Fall erfolgt die Isolierung mittels Plattenlysatmethode.

C. 2.9.4. Isolierung von Lambda-DNA im präparativen Maßstab (Davis et al., 1986)

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium (250 ml pro Platte)
LB-Topagarose	0,7 % Agarose in LB-Medium (50 ml pro Platte, auf 50°C vorgewärmt)
TM-Puffer	50 mM Tris/Cl, 10 mM MgSO_4 , pH 7,5 (30 ml/Platte)
PEG-Puffer	20 % Polyethylenglykol, 2,5 M NaCl in TM-Puffer
CsCl-Lösungen	
Dichte = 1,45	95 g CsCl auf 75 ml TM-Puffer (1,5 ml/Zentrifugenröhrchen)
Dichte = 1,50	67 g CsCl auf 82 ml TM-Puffer (1,5 ml/Zentrifugenröhrchen)
Dichte = 1,70	95 g CsCl auf 95 ml TM-Puffer (1,0 ml/Zentrifugenröhrchen)
RNase A	1 mg/ml H_2O , 10 min bei 100°C vorbehandelt
Proteinase K	1 mg/ ml H_2O

Dialysepuffer 10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0 (TE-Puffer)

Proteinase K-Lösung (pro ml dialysierte Phagensuspension)
60 ul 0,5 M EDTA
75 ul 10 % SDS
75 ul (1 mg/ml) Proteinase K
290 ul H₂O

E.coli Stamm Y1090, r⁻, 200 ul MgSO₄-Suspension (OD_{578nm} ca. 2.0)

Lambda gt11-Klon, 10 ul Phagensuspension (10¹⁰ pfu/ml)

Vorbehandlung der Dialyseschläuche:

Dialyseschläuche werden je 10 Minuten in 2 % NaHCO₃/1 mM EDTA bzw. H₂O gekocht. Zwischen den beiden Kochschritten werden sie mit H₂O abgespült und danach bis zur Benützung in 1 mM EDTA bei 4°C gelagert.

Durchführung

Die Durchführung erfolgt wie unter C. 2.9.3. beschrieben, jedoch mit größeren Volumina. Das Phagenpellet wird durch Aufnehmen in TM-Puffer (1/25 des Ausgangsvolumens), Zentrifugation und zweimaliger Extraktion mit CHCl₃ von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Mit 4 ml Phagensuspension (mit CsCl auf 0,5 mg CsCl/ml Suspension eingestellt) wird die CsCl-Gradientenlösung überschichtet. Die Phagenbande ist nach 4 Stunden Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 22000 rpm und 20°C im Auflicht sichtbar. Diese Bande wird isoliert, mit CsCl-Lösung der Dichte 1,5 auf 4 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (48 h/27000 rpm/20°C, Ausschwingrotor). Nach Isolierung der Phagensuspension und Dialyse gegen TE-Puffer werden die Phagen mit Proteinase K-Lösung eine Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wird dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert, die organische Phase mit TE-Puffer reextrahiert, die wässrigen Phasen vereinigt und mit CHCl₃ die Phenolreste entfernt. Die DNA wird gefällt und in H₂O aufgenommen. Die Konzentration- und Reinheitsbestimmung erfolgt photometrisch. In der Regel kann pro Platte ein Milligramm Phagen-DNA erhalten werden.

C. 2.9.5. Restriktionskartierung (Maniatis et al., 1982)

Lösungen

Enzympuffer

Niedrigsalz-Puffer

10 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5

Mittelsalz-Puffer 10 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, pH 7,5

Hochsalz-Puffer 50 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, pH 7,5

Enzyme Eco RI, 90 U/ul, Hochsalz-Puffer
Sph I, 10 U/ul, Hochsalz-Puffer
BamH I, 10 U/ul, Mittelsalz-Puffer
Hind III, 12 U/ul, Mittelsalz-Puffer
Sst I, 5 U/ul, Niedrigsalz-Puffer

Durchführung

Zur Kartierung werden im allgemeinen drei Wege beschritten:

- 1.) Partieller Einzelverdau mit Eco RI (1 U/1, 3, 7, 15, 30, 60 min/37°C/30 ul).
- 2.) Vollständiger Einzelverdau mit Bam HI, Hind III, Sst I und Sph I (3 h/ 37°C/30 ul).
- 3.) Vollständiger Doppelverdau mit einer Kombination von Bam HI, Hind III, Sst I bzw. Sph I (je 1,5 h/37°C/30 bzw. 50 ul).

Pro Restriktionsansatz werden ca. 5 ug Lambda-DNA eingesetzt. Die Doppelverdaus werden im Eintopfverfahren durchgeführt: zuerst wird mit dem Enzym, das bei niedrigerer Salzkonzentration seine optimale Aktivität besitzt und dann mit dem zweiten bei höherer Salzkonzentration inkubiert.

In den BamH I/Sst I- und Hind III/Sst I-Ansätzen wird zunächst mit Sst I unter niedrigen Salzkonzentrationen geschnitten (30 ul, 1,5 h, 37°C), mit 0,5 M NaCl-Lösung auf 50 mM Endkonzentration aufgefüllt und schließlich mit BamH I bzw. Hind III inkubiert (50 ul, 1,5 h, 37°C).

Bei den BamH I/Sph I- und Hind III/Sph I-Ansätzen wird zuerst im Mittel-Salz-Milieu mit BamH I und Hind III gespalten (30 ul, 1,5 h, 37°C), dann mit 0,5 M NaCl bzw. 0,2 M

Tris, pH 7,5, bis zu 100 mM bzw. 50 mM Endkonzentration aufgefüllt und schließlich mit Sph I inkubiert (50 μ l, 1,5 h, 37°C).

C. 2.9.6. Isolierung des Fusionsproteins (Young & Davis, 1983)

Lösungen

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium (250 ml pro Platte)
LB-Top-Agarose	0,7 % Agarose in LB-Medium (50 ml pro Platte, auf 50°C vorgewärmt)
TM-Puffer	50 mM Tris/Cl, 10 mM MgSO ₄ , pH 7,5 (30 ml pro Platte)
DNase-Lösung	1 mg/ml 0,1 M MgCl ₂
1 M DFP	
0,2 % Maltose in LB-Medium	
10 mM MgSO ₄	
10 mM IPTG in H ₂ O	
E.coli-Stamm Y1089,	1 μ l MgSO ₄ -Suspension (7×10^8 Zellen/ml)
Amplifizierte Lambda Klone,	20 μ l Phagensuspension (min. 10^{10} pfu/ml)

Durchführung

Zur Infektion werden Phagen und Bakterien im Verhältnis 100:1 in 20 μ l Volumen bei 28°C inkubiert. Nach 20 min wird der Infektionsansatz mit TM-Puffer verdünnt, sodaß pro LB-Platte 100 Zellen in einem geeigneten Volumen ausgestrichen werden können; die Inkubation erfolgt über Nacht bei 28°C. Kolonien davon werden parallel auf zwei LB-Platten überführt und alternativ bei 28 bzw. 42°C inkubiert. Kolonien, die nur bei 28°C, nicht aber bei 42°C wachsen (i.e. Bakterien, die mit Lambda-Phagen infiziert sind), werden nochmals auf zwei LB-Platten ausgestrichen und wie oben bei 28 bzw. 42°C inkubiert. Infizierte Bakterien werden in 30 ml LB-Medium - vorgelegt in einem 250 ml Schikanenkolben - bis zu einer

OD₅₇₈ von 0,5 herangezogen.

Nach Inkubation im Schüttelwasserbad (20 min, 45°C), Induktion mit IPTG (Endkonzentration 10 mM) und weiterer Inkubation (1 h, 37°C) werden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (5 min, 6000 rpm, 25°C). Das Bakterienpellet wird in 600 µl TM-Puffer aufgenommen, schockgefroren und nach dem Auftauen zur 30minütigen Inkubation bei 37°C mit 24 µl DFP, 10 µl DNase I-Lösung versetzt. Der Überstand mit den bakteriellen Proteinen wird durch Zentrifugation isoliert (10 min, 25°C, 8000 rpm) und bei -20°C gelagert.

C. 2.9.7. Umklonierung in den Sequenzierungsvektor M13 (Amersham-Handbuch)

Lösungen

2 x TY-Medium	16 g Bacto Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 1 l H ₂ O
H-Agar	1 % Trypton, 0,8 % NaCl, 1,2 % Agar
H-Top-Agar	1 % Trypton, 0,8 % NaCl, 0,8 % Agar
TE-Puffer	10 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Hochsalz (10x)	50 mM Tris/Cl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 100 mM NaCl, pH 7,5
Ligase-Puffer	100 mM Tris/Cl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl ₂ , pH (10 x) 7,5

1,5 M NaCl

Restriktionsansatz

90 µl rekombinante Lambda-DNA (ca. 10 µg)
1 µl Eco RI (90 U/µl)
18 µl Hochsalzpuffer
71 µl H₂O

Restriktionsansatz zur forcierten Klonierung

90 µl rekombinante Lambda-DNA (ca. 10 µg)
1 µl Bam HI (10 U/µl)
1 µl Hind III (12 U/µl)
18 µl Mittelsalzpuffer
70 µl H₂O

Ligationsansatz

5 µl Fremd-DNA (ca. 100 ng)
2 µl Vektor-DNA (ca. 20 ng)
1 µl 10 x Ligase Puffer
1 µl 50 mM DTT
1 µl (0,5 U/µl) T4 DNA Ligase

Transformationsansatz

5 ul Ligationsansatz
300 ul kompetente Zellen
3 h/0°C
3 min/42°C
200 ul frisch gewachsene Zellen
40 ul 100 mM IPTG
40 ul 2 % X-Gal in Dimethylformamid
3 ml H-Top-Agar

E.coli Stamm JM 103

Durchführung

Rekombinante DNA wird, wie oben beschrieben (C. 2.9.3.), isoliert und im Restriktionsansatz zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wird neben entsprechenden DNA-Markern auf einem 1 % Agarosegel (mit 1 µg Ethidiumbromid pro ml Gellösung) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach zwei Stunden wird ober- und unterhalb der Fremd-DNA-Bande das Gel eingeschnitten und Filterpapiere vom Typ DE 81 eingezogen. Die Elektrophorese wird solange fortgesetzt, bis die Fremd-DNA in die Filterstreifen gewandert ist. Elution erfolgt mit 400 µl und 100 µl 1,5 M NaCl-Lösung. Beide Überstände werden vereinigt, phenolisiert, mit CHCl_3 ausgeschüttelt und mit Ethanol/NaOAc gefällt (siehe C. 2.9.3.). Diese so gereinigte DNA kann direkt zur Ligation eingesetzt werden.

Ligation

Für den Ligationansatz werden entweder Eco RI-gespaltener M13 mp18-Vektor oder Bam/Hind-geschnittene M13 mp18/mp19-Vektoren mit Fremd-DNA 18 Stunden bei 14°C inkubiert (siehe oben).

Herstellung kompetenter Zellen

Eine Übernachtskultur von JM 103 (siehe C. 2.9.1.) wird durch Verdünnen in die logarithmische Wachstumsphase gebracht; nach 90 min Inkubation bei 37°C ist i.a. eine OD_{578} zwischen 0,3 und 0,6 erreicht. Die Zellen werden zunächst geerntet (6000 rpm, 3 min), im halben Ausgangsvolumen 50 mM CaCl_2 aufgenommen und 20 min im Eisbad inkubiert; anschließend werden sie erneut zentrifugiert (6000 rpm, 3 min) und in 1/10 des Ausgangsvolumens 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Danach können diese Zellen direkt zur Transformation eingesetzt

werden. Die Transformationsraten steigen jedoch, wenn die Zellen noch einigen Stunden auf Eis belassen werden. Inkubationszeiten von 3 h erwiesen sich hierbei als vorteilhaft.

Transformation

5 μ l des Ligationsansatzes werden mit 300 μ l CaCl_2 -Suspension kompetenter Zellen gemischt und zwischen 40 min und 3 h im Eisbad inkubiert; dieser Ansatz wird dann für drei Minuten auf 42°C erhitzt, gleich anschließend mit IPTG, X-Gal und frischen JM 103-Zellen auf H-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Isolierung einzelsträngiger, rekombinanter M13-DNA

Infizierte Kolonien (Zonen verzögerten Wachstums) mit farbloser Morphologie (M13 mit rekombinantem lac z-Gen) werden aus dem Agar ausgestochen und in 1,5 ml einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur von JM 103 5 h bei 37°C herangezogen. Nach zwei Zentrifugationsschritten (12.000 rpm, 5 min) wird aus dem Überstand mit 200 μ l PEG-Lösung (siehe C. 2.9.3.) die einzelsträngige M13-DNA ausgefällt. Nach Reinigung dieser DNA (siehe C. 2.9.3.; ohne DNase I-Inkubation) wird sie direkt zur Sequenzierung eingesetzt.

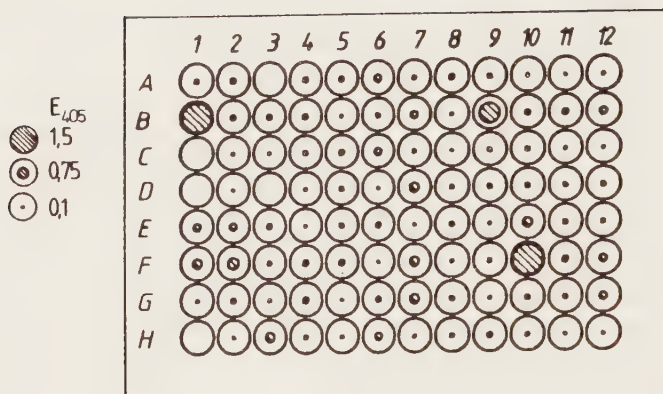


Abb.5. Test der Zellüberstände von Hybridomazellen auf Anti-Akrosin-Antikörper mittels indirektem ELISA. Beschichtung: 0,5 ug/ml Eberakrosin; 16 h/4°C. 1. Antikörper: 100 ul Zellüberstand und 100 ul Puffer C; 2 h/37°C. 2. Antikörper: POD-markiertes Anti-(Maus-IgG)-IgG (aus Ziege); 1:2000; 3 h/37°C. Substrat: ABTS; 30 min/37°C

D. 1.3. Western-Blotting

Für Eberakrosin werden in der Literatur mehrere Formen mit unterschiedlichen Molekulargewichten beschrieben. Dabei handelt es sich bei den niedermolekularen Stufen um autoproteolytische Zersetzungsprodukte. Nach der von Müller-Esterl et al. (1980) durchgeführten, fünf Stufen umfassenden Reinigung wird im SDS-PAGE homogenes Akrosin mit dem Molekulargewicht von 38 kDa erhalten. Gereinigtes Eberakrosin und Rohextrakt wurden parallel einer SDS-Gel-Elektrophorese unterzogen und auf Nitrozellulose transferiert. Im Immunoprint wurde mit Hyperimmunserum eine einzige Akrosin-Bande mit Mr von ca. 38 kDa erkannt, während im Rohextrakt 2 dominante Banden mit apparenten Molekulargewichten von 38 und 50 kDa detektiert wurden (Abb. 6, Linien 9 & 10). Ein vergleichbares Muster wurde auch mit den monoklonalen Antikörpern erhalten (Abb.

6, Linien 1 & 2, BAK I - Aszites; Linien 3 & 4, BAK II - Zellüberstand; Linien 5 & 6, BAK III - Zellüberstand; Linien 7 & 8, BAK IV - Zellüberstand). Die Detektion mit BAK III fiel etwas schwächer aus, da die Antikörper-Konzentration in diesem Fall geringer war. (siehe auch Abb. 7).

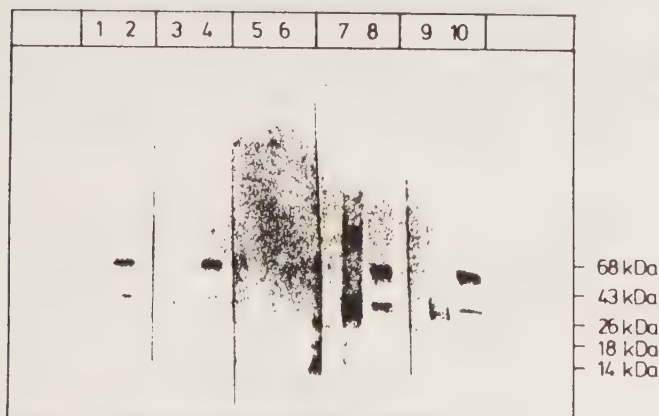


Abb.6. Spezifität monoklonaler Antikörper gegen Eberakrosin mittels Western-Blot und Immunoprint.

5 - 15 % SDS-PAGE, 3 µg gereinigtes Eberakrosin, 5 µl Rohextrakt pro Lauflinie.

Linien 1 & 2, BAK I - Aszites; Linie 3 & 4, BAK II - Zellüberstand; Linien 5 & 6, BAK III - Zellüberstand; Linien 7 & 8, BAK IV - Zellüberstand, Linien 9 & 10, Hyperimmunserum. 1. Antikörper: Hyperimmunserum, BAK I - Aszites; 1:1000; BAK II - IV - Zellüberstand (1:2); 16 h/4°C. 2. Antikörper: biotinylierter Anti-(Maus-IgG)-IgG (aus Ziege); 1:400; 3 h/RT. BAP-Komplex: 1:1000; 30 min/RT. Substrat: 4-Chlor-1-Naphthol

D. 1.4.

Bestimmung des relativen Titors

Der Titer an monoklonalen Antikörpern wurde mittels indirektem ELISA gemessen. Als Titer (relativer Wert) wird die größte Verdünnung angegeben, bei der gerade noch eine maximale Extinktion im ELISA ($E_{405} = 1,5$) erreicht wird. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper BAK I im Aszites und BAK II - IV im Zellüberstand getestet. Für BAK I aus Aszites ergab sich ein Titer von 1:10000; für BAK II 1:100, für BAK III 1:1 und BAK IV 1:32. Normalerweise liegt der Titer von Zellkulturen um den Faktor 100 bis 1000 niedriger als der von Aszites (siehe Abb. 7).

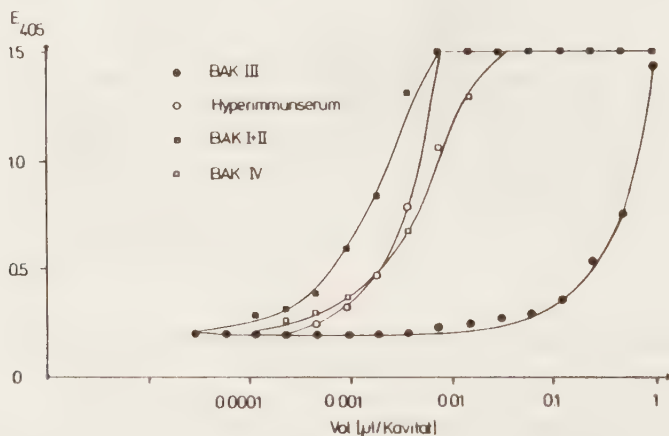


Abb.7. Bestimmung des relativen Titors der monoklonalen Antikörper mittels indirektem ELISA

Beschichtung: 0,5 µg Eberakrosin/ ml; 16 h/4°C. 1. Antikörper: 2ⁿ-Verdünnungsreihe, 16 Stufen; Ausgangskonzentrationen: Hyperimmuns serum und BAK I 1:100; BAK II - IV unverdünnt; 2 h/37°C. 2. Antikörper: POD markiertes Anti-(Maus-IgG)-IgG (aus Ziege); 1:5000; 3 h/37°C. Substrat: ABTS; 30 min/37°C

D. 1.5.

Bestimmung der Epitopspezifität

Die relativen Epitopspezifitäten der monoklonalen Antikörper wurden über einen kompetitiven ELISA ermittelt (siehe Abb.8.). Erkennt ein unmarkierter Antikörper dieselbe oder eine räumlich eng benachbarte Stelle auf dem Antigen, so wird er mit steigender Konzentration den biotinylierten Antikörper verdrängen. Dagegen kann ein Antikörper, der gegen ein unterschiedliches Epitop gerichtet ist, die Bindung des biotinylierten Antikörpers nicht beeinflussen.

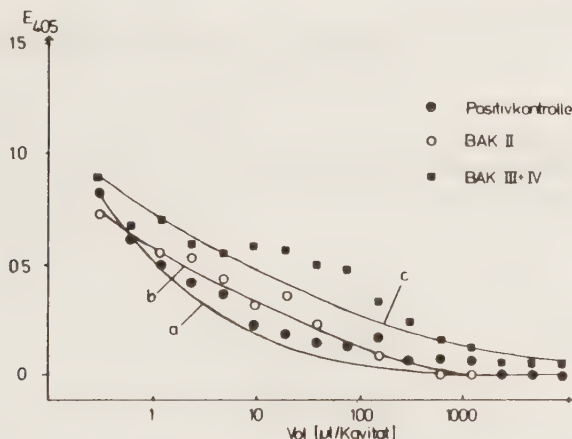


Abb.8. Bestimmung der relativen Epitopspezifität der vier monoklonalen Antikörper mittels kompetitivem ELISA
 Kurve a: Positivkontrolle (biot. BAK I und 16 Verdünnungsstufen von nicht-biotinyliertem BAK I).
 Kurve b: biot. BAK I und 16 Verdünnungsstufen von nicht-biotinyliertem BAK II.
 Kurve c: biot. BAK I und 16 Verdünnungsstufen von nicht-biotinyliertem BAK III und BAK IV.
 Beschichtung: 5 µg Eberakrosin/ml; 16 h/4°C. 1. Antikörper: 0,25 ng/100 µl biotinylierter BAK I und 100 µl unmarkierte BAK II - IV; 16 Stufen einer Verdünnungsreihe (2^n); 3 h/37°C.
 BAP-Komplex (1:1000); 30 min/37°C. Substrat: ABTS; 30 min/37°C.

Zur Bestimmung der Epitopspezifität wurden gleiche Volumina einer konstanten Menge eines biotinylierten monoklonalen Antikörpers mit einer Verdünnungsreihe (2^n) eines zweiten, nicht biotinylierten Antikörpers gemischt. Diese Mischung wurde auf Mikrotiterplatten pipettiert, die mit Eberakrosin beschichtet waren. Die Detektion erfolgte über einen BAP-Komplex. Als Sonde diente biotinylierter BAK I, der mit den nicht markierten Antikörpern (BAK II - IV, aus Zellüberständen) konkurrierte. Durch dieses Experiment stellte sich heraus, daß alle vier Antikörper dasselbe oder ein benachbartes Epitop auf dem Akrosin-Molekül erkennen.

D. 1.6. Subtypisierung der monoklonalen Antikörper

Wie aus Abb. 9. zu sehen ist, gehören BAK I und II zum Typ IgG1, kappa. BAK III gehört zur IgM-kappa-Subklasse und BAK IV ist vom IgG1-lambda-Subtyp.

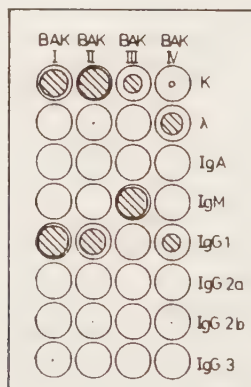


Abb.9. Subtypisierung von BAK I - IV

Beschichtung: 0,5 µg Eberakrosin/ml; 16 h/4°C. 1. Antikörper: Zellüberstände (1:2); 2 h/37°C. 2. Antikörper: Anti-Subtypen-IgG aus Kaninchen (1:3000); 2 h/37°C. Peroxidase gekoppelt an Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG (1:20000); 2 h/37°C. Substrat: ABTS; 30 min/37°C

Für die Subtypenbestimmung wurde der indirekter ELISA etwas modifiziert: die ELISA-Platten wurden mit Eberakrosin beschichtet und mit 1:2 verdünnten Zellüberständen inkubiert. Anschließend wurden spezifische Antisera (aus Kaninchen) gegen die einzelnen Subtypen der Maus-Immunglobuline aufgetragen (kappa, lambda, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA). Die Detektion erfolgte durch POD-konjugierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG.

D. 2. RNA-Techniken

D. 2.1. Gewinnung von Gesamt-RNA

RNA wurde mittels Guanidinthiocyanat/Guanidinhydrochlorid-Methode aus Ebertestes isoliert. Das Testesgewebe stammte von geschlechtsreifen Ebern. Aus 12 g Testes konnten 13,5 mg Gesamt-RNA gewonnen werden.

D. 2.2. Gewinnung von poly-A⁺ RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Ethanol gefällt, in Probenpuffer aufgenommen und dann in Gegenwart von 0,5 mM LiCl an eine Oligo dT-Säule gebunden. Die Elution erfolgte mit Probenpuffer ohne LiCl-Zusatz. Die Ausbeute an polyadenylierter RNA betrug 6,7 % (0,9 mg/13,5 mg) der Gesamt-RNA.

D. 2.3. Herstellung von Retikulozytenlysat

Die Analyse der isolierten mRNA erfolgte in vitro an Polysomen aus Retikulozyten. Dazu wurden die Retikulozyten aus anämisierten Kaninchen gewonnen und zur Freisetzung der enthaltenen Polysomen durch Schockgefrieren lysiert. In diesen Lysaten sind jedoch noch große Mengen an endogener Globin-mRNA enthalten, die mit exogener RNA konkurrieren und so deren Analyse stören würde. Zur Hydrolyse dieser endogenen RNA wurde eine Ca⁺⁺-abhängige Nuclease eingesetzt, die

nach erfolgter Reaktion durch den spezifisch Ca^{++} -Ionen bindenden Komplexbildner EGTA inaktiviert wurde. Damit ist das resultierende Lysat prinzipiell zu Translationstests einsetzbar; zur Abtrennung der Nuklease wurde es sicherheitshalber jedoch noch an G 50-Sephrose fraktioniert. Die erste, größere von insgesamt zwei Fraktionen mit den Polysomen wurde auf ihre Translationsaktivität getestet. Die Fraktionen mit der größten Aktivität (Fraktionen 17 - 25) wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

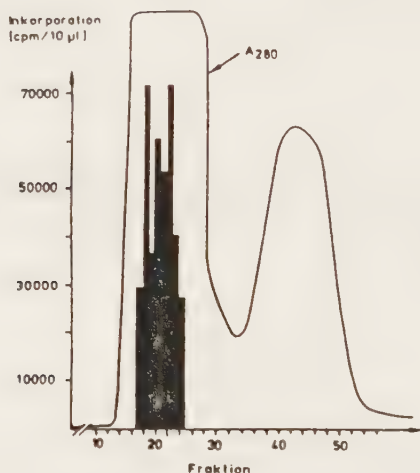


Abb.10. Gelfiltration der lysierten Retikulozyten an Sephadex G 50.

Abszisse: Nummer der Fraktionen; Volumen 1 ml/Fraktion. Ordinate: Einbau von ^{35}S -Methionin in neu synthetisiertes Protein (schwarze Kolumnen). Die durchgezogene Linie entspricht der Absorption des Eluats bei 280 nm.

D. 2.4. Optimierung der zellfreien Proteinbiosynthese

Die Inkorporation von ^{35}S -Methionin in de novo-synthetisierte Proteine ist ein direktes Maß für die Proteinsyntheserate eines Retikulozytenlysats. Damit kann die Translations-effizienz über die TCA-fällbare Radioaktivität direkt bestimmt werden. Die hier angegebenen Zahlenwerte stammen aus Doppelwertbestimmungen.

Während der Versuchreihen zeigte es sich, daß es außerordentlich schwierig war, reproduzierbar hohe Inkorporationsraten zu erhalten. Die Zahlenwerte der einzelnen Tests sind daher nur innerhalb eines Tests aussagekräftig. Werte aus zwei verschiedenen Ansätzen sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar.

Optimierung der $\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ -Konzentrationen

Durch Gelfiltration werden neben der Nuklease, Ca^{++} und EGTA auch für die Protein-Biosynthese wichtige Komponenten (ATP, GTP, Spermidin, Glucose-6-Phosphat, Aminosäuren, Salze) aus dem Translationssystem entfernt. Nach erfolgter Gelfiltration muß deshalb das Lysat supplementiert werden. Unter diesen Parametern ist das Konzentrationsverhältnis von K^+ bzw. Mg^{++} deshalb entscheidend, weil damit sehr einfach und effektiv die Frequenz der Initiation beeinflusst wird. Zudem benötigt jede RNA, in Abhängigkeit von Art und Herkunft der Präparation, ein für die eigene Initiation optimales Salzverhältnis. Zur Optimierung der Initiationeffizienz wurde die Inkorporationsrate der selbst hergestellten Retikulozytenlysate bei verschiedenen K^+ - bzw. Mg^{++} -Konzentrationen im Translationsansatz gemessen (Tab. 2). Die besten Ergebnisse wurden mit 1,2 mM Mg^{++} und 100 mM K^+ erzielt.

Tab.2. Optimierung der K^+/Mg^{++} -Konzentrationen im zellfreien Translationssystem

Die Werte in der Tabelle geben die TCA-präzipitierbare Radioaktivität (cpm) pro 2 μ l Translationsmischung bei unterschiedlichen Konzentrationen von K^+/Mg^{++} an.

K (mM)	25	50	100	150
Mg (mM)				
0,4	5482	7002	7592	7342
0,8	16229	14209	13227	23415
1,2	21366	32297	50226	41982
1,6	19301	30058	49390	27149

Optimierung der ^{35}S -Methionin-Konzentration

Im allgemeinen ist bei der Zugabe von Aminosäuren nur darauf zu achten, daß eine kritische Grenzkonzentration (50 μM , Pelham & Jackson, 1976), die zur Kettentermination führen würde, nicht unterschritten wird. Zur Bestimmung dieser Grenzkonzentration wird eine Aminosäure verwendet, die in Lysaten im Vergleich zu den restlichen 19 Aminosäuren unterrepräsentiert vorkommt. Damit ist zumindest statistisch gewährleistet, daß die Konzentration dieser Aminosäure der Faktor ist, der den Kettenabbruch bedingt. D.h., daß generell auch für alle anderen Aminosäuren eine Konzentration oberhalb dieser Grenze ausreicht, um sämtliche angebotenen mRNAs korrekt bis zum 3'-Ende in Protein zu übersetzen. Als Pilot-Aminosäure wurde der Einbau von radioaktiv-markiertem Methionin beobachtet. Ist die Inkorporation von Methionin direkt proportional zum eingesetzten Methionin, wird davon ausgegangen, daß die Elongation frühzeitig durch Mangel an Methionin gestoppt wird. Deshalb ist es geboten, im Sättigungsbereich der Kurve zu arbeiten. Zur Optimierung der im Ansatz zu verwendenden ^{35}S -Methionin-Konzentration wurde das Translationsgemisch auf 1,2 mM Mg^{++} bzw. 100 mM K^+ eingestellt und die Einbaurate von Methionin (mit TCA fällbare Radioaktivität) in Abhängigkeit von seiner angebotenen spezifischen Aktivität gemessen. Die Sättigungsgrenze lag bei ca. 1,2 μCi spezifische Aktivität/ μl Translationsansatz. Bei höheren spezifischen Aktivitäten (d.h. bei höheren Methionin-Konzentrationen) stieg die Translationseffizienz nur noch geringfügig an (vgl. Abb. 11).

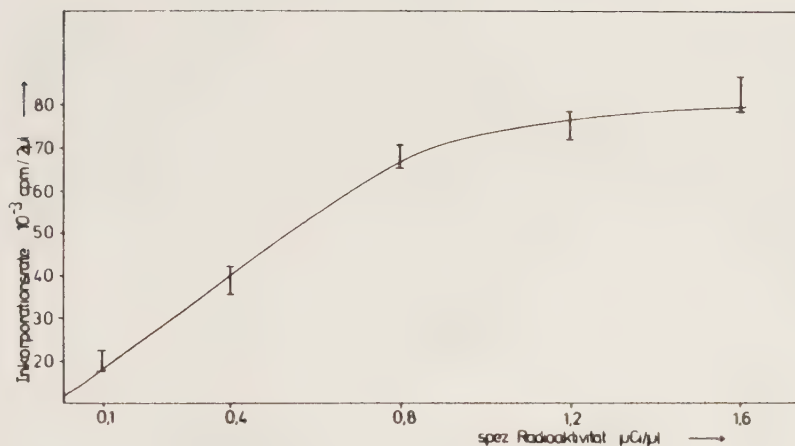


Abb.11. Optimierung der ^{35}S -Methionin-Konzentration im zellfreien Translationssystem.

Auf der Abszisse ist die spezifische Radioaktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ Translationsgemisch) aufgetragen. Die Ordinate gibt die Inkorporationsrate in $\text{cpm}/2 \mu\text{l}$ Translationsgemisch an. Bei $1,6 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ beträgt die fällbare Radioaktivität $84.000 \text{ cpm}/2 \mu\text{l}$

Optimierung der exogenen mRNA-Konzentrationen

Eine Optimierung der Konzentration an exogener mRNA im Translationsansatz ist deshalb nötig, da die RNA-Präparationen meist Translationsinhibitoren enthalten, die durch Verdünnen der RNA-Lösung oft in einer unschädlichen Konzentration gehalten werden können. Im Test wurde bei 100 mM K^+ , 1,2 mM Mg^{++} und 1,6 uCi die Konzentration an zugefügter testikulärer mRNA zwischen 4 und 120 ng variiert. Die beste Translationsausbeute (82.000 cpm/2ul) wurde mit 30 bis 50 ng mRNA erhalten.

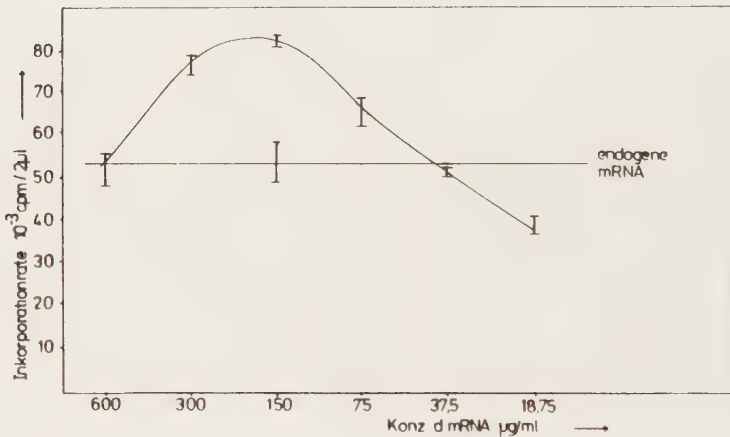


Abb.12. Optimierung der exogenen mRNA-Konzentration im zell-freien Translationssystemen

Auf der Abszisse sind die Anfangskonzentrationen der testikulären mRNA aufgetragen (Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 260 nm). Die Ordinate gibt die mit TCA fällbare Radioaktivität pro 2 ul Translationsgemisch wider. Im Vergleich dazu ist die Inkorporationsrate ohne Zugabe von exogener mRNA als waagrechte Linie angegeben (endogene Inkorporation).

Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde mit 1,6 μCi , 100 mM K^+ , 1,2 mM Mg^{++} und 50 ng mRNA (pro μl Translationsgemisch) gearbeitet, um maximale Inkorporationsraten zu gewährleisten. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abb. 13 gezeigt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Lysat-Präparationen (Lysat 1 und Lysat 2) und die Inkorporation der endogenen bzw. exogenen mRNA verglichen. Als Ergebnis wurden für die Translationsprodukte apparente Molekulargewichte von ca. 10 kDa bis über 100 kDa erhalten.



Abb.13. SDS-Elektrophorese und Autoradiographie der Translationsprodukte verschiedener mRNAs.

10 - 15 % PAA, Auftrag: 200.000 cpm/Lauflinie, Detektion: Fluorographie, 50 ng mRNA/ μl Translationsgemisch.

Linie 1: Lysat 1/testikuläre mRNA. Linie 2: Lysat 2/testikuläre mRNA. Linie 3: Lysat 1/placentale mRNA. Linie 4: Lysat 2/placentale mRNA. Linie 5: Lysat 1/Globin-mRNA. Linie 6: Lysat 2/Globin-mRNA. Linie 7: Lysat 1/ohne Zusatz exogener mRNA. Linie 8: Lysat 2/ohne Zusatz exogener mRNA.

D. 2.5. Immunpräzipitation

Die Isolierung kleinster Mengen Proteine aus komplexen Translationsgemischen beruht auf der Möglichkeit, Antikörper an feste Phasen zu binden, die leicht durch Zentrifugation zu isolieren sind. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit Protein A eingesetzt, das an Sepharose gekoppelt vorlag. Protein A aus *Staphylococcus aureus* erkennt die F_C -Regionen bestimmter Immunglobuline, die ihrerseits wiederum Proteine binden. Antikörper, die nicht von Protein A erkannt werden, werden nach Affinitätsreinigung direkt an aktivierte Sepharose gebunden. Zur Gelanalyse wird anschließend das Protein vom Antikörper in Gegenwart von SDS durch Erhitzen gelöst und elektrophoretisch aufgetrennt.

Nachdem es gelungen war, Lactogen aus einem placentalen Translationsansatz zu isolieren (Abb. 14, Linie 2) und dieses Ergebnis zu spezifizieren (Abb. 14, Linie 3), konnte das System als etabliert angesehen werden. Im Anschluß daran wurden testikuläre Translationsgemische untersucht. Daraus konnten mit Anti-Akrosin-Antikörpern zwei Proteinbanden mit den M_r 50 und 25 kDa detektiert werden (Abb. 14, Linie 5). Beide Banden waren spezifisch für testikuläre Ansätze (Abb. 14, Linie 3); sie wurden nicht von Antikörper gegen placentales Lactogen erkannt (Abb. 14, Linie 7) und waren durch nicht-radioaktiv-markiertes Akrosin verdrängbar (Abb. 14, Linie 6). Dagegen konnten mittels der Protein A-Technik und Antiserum gegen Akrosin kein Protein detektiert werden.

Mit dem vorliegenden Experiment konnte gezeigt werden, daß testikuläre mRNA für Proteine codiert, die von Antikörpern gegen Akrosin erkannt werden können.

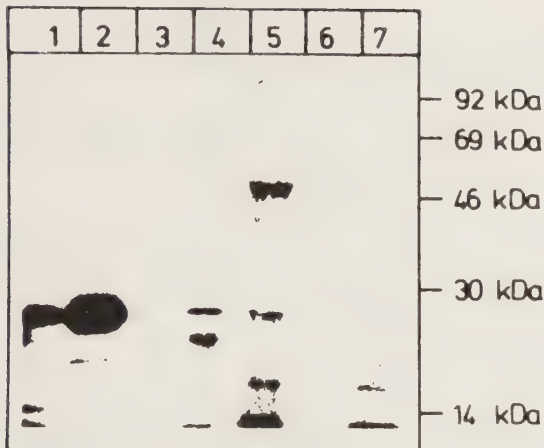


Abb.14. Immunpräzipitation von zellfrei translatierter testikulärer mRNA.

Zellfreie Translationsprodukte unterschiedlicher mRNA wurden durch SDS-Elektrophorese aufgetrennt; hier ist eine Autoradiographie der ^{35}S -markierten und immunpräzipitierten Produkte gezeigt. In den Experimenten wurden 40 μl Sepharosesuspension, für die Protein A-Technik jeweils 10 μl Antiserum und für die Verdrängungsreaktion mit nicht radioaktiv-markiertem Akrosin 100 $\mu\text{g}/10$ μl eingesetzt.

Linie 1: placentale mRNA. Linie 2: placentale mRNA und Antiserum gegen placentales Lactogen. Linie 3: placentale mRNA und immobilisierte Anti-Akrosin-Antikörper. Linie 4: testikuläre mRNA. Linie 5: testikuläre mRNA und immobilisierter Anti-Akrosin-Antikörper. Linie 6: testikuläre mRNA und immobilisierter Anti-Akrosin-Antikörper und isoliertes ("kaltes") Akrosin. Linie 7: testikuläre mRNA und Antiserum gegen Lactogen

D. 3.

Mikrobiologische Arbeiten

D. 3.1.

Untersuchung einer humanen testikulären cDNA-Bank

Es stand eine cDNA-Bank im Bakteriophagen Lambda gt 11 zur Verfügung, die aus humaner Testis eines gesunden 50-jährigen Patienten konstruiert worden war. Die Bank enthielt 1×10^9 pfu/ml mit 82 % Rekombinanten und 1×10^6 unabhängigen Klonen mit einer mittleren Insertionsgröße von 1,2 kB (0,7 - 3,3 kB). Zum initialen Durchmustern der Bank mit Antikörper-sonden wurden die Phagen mit dem dafür geeigneten E.coli-Stamm Y 1090 inkubiert und die infizierten Bakterien auf 14 Platten ausgesät. (50.000 pfu pro Platte), was einer Gesamtzahl von 7×10^5 pfu entsprach. Nach dreistündigem Wachstum bei 42°C wurde mit IPTG die Synthese der β -Galaktosidase induziert und das Fusionsprotein 3 Stunden bei 37°C expri-miert. Für die Antikörperdetektion wurden immunselektierte Antikörper gegen Eberakrosin verwendet, die bekanntlich mit menschlichem Akrosin kreuzreagieren (Schill, 1975). Die Nitrozellulosefilter wurden nacheinander mit immunselek-tierten Anti-Eberakrosin-Antikörpern aus Schaf, mit biotiny-lierten Anti-(Schaf-IgG)-IgGs und mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert. Die Detektion erfolgte über die Farbreaktion mit Chlornaphthol/ H_2O_2 als Substrat. Insgesamt wurde die Bank in zwei Durchgängen auf Akrosin-produ-zierende "Klone" untersucht. Im ersten Durchgang konnten aus 200.000 Phagen 7 positiv reagierende "Klone" (I-1 bis I-7), in einem zweiten aus 500.000 Phagen 14 "Klone" (II-1 bis II-14) erhalten werden. Das sind 0,003 % der Gesamtzahl an Rekombinanten. Um diese Phagenklone zu vereinzeln, wurden sie in drei weiteren Testrunden mit abnehmender Plaquedichte ausgesät (10^4 - 10^3 - 10^2 pfu/Platte) und wie oben detek-tiert, bis schließlich 17 Klone übrigblieben (I-2 bis I-4 und II-1 bis II-14).

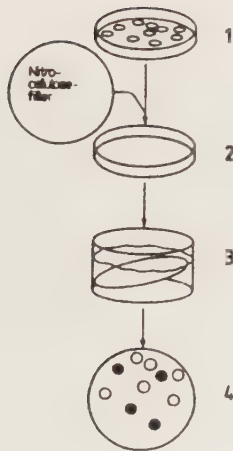


Abb.15. Prinzip des Plaque-Lift-Tests

Schritt 1: Ausplattieren der mit Lambda-Phagen infizierten E.coli-Bakterien auf Agar-Nährmedium-Platten. Schritt 2: Auflegen der mit IPTG getränkten Nitrozellulosefilter und der dadurch bedingten Induktion der von der Phagen-DNA codierten β -Galaktosidase einschließlich des daran fusionierten Fremdproteins. Schritt 3: Abziehen und Inkubation der Filter mit diversen Antikörper-Lösungen (siehe Text) und dem Biotin-Avidin-Komplex zur Verstärkung der Detektion. Schritt 4: Detektion der Antikörperkomplexe durch Substratreaktion der biotinylierten Peroxidase

D. 3.2. Kontrollen

In den Kontrollexperimenten wurden Lambda gt 11-Wildtyp (ohne Insertion), sowie Lambda-Klone, die das Gen für Ovalbumin und C $\bar{I}$ -Inhibitor enthalten, eingesetzt ebenso alle testikulären Klone, die aus drei Subklonierungen erhalten worden waren. Diese Klone wurden einzeln jeweils mit Anti-Eberakrosin, Anti-Ovalbumin, Anti-C $\bar{I}$ -Inhibitor, Anti-Akrosin-Inhibitor I und Anti-Akrosin-Inhibitor II (beide Inhibitoren stammen aus Eberspermatozoa) getestet. Aus diesen Tests gingen folgende Klone hervor: I-2, I-3, I-4 und II-5, II-7, II-8, II-9, II-10, II-12.

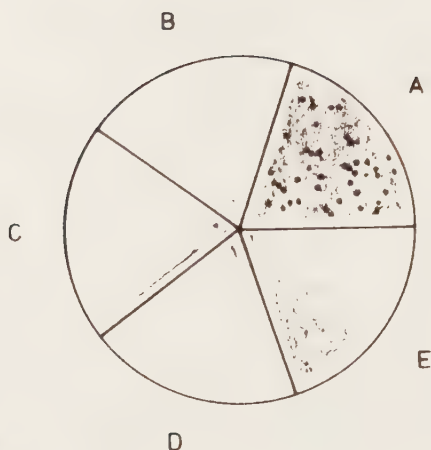


Abb.16. Ergebnisse der 1. Spezifitätstestrunde

Hier ist repräsentativ das Ergebnis der Antikörper-Spezifitäts-Tests für Klon AII-9 gezeigt. Inkubationsdauer der 1. Antikörper: über Nacht bei 4°C, der 2. Antikörper 2 h/RT des BAP-Komplexes 30 min/RT. 2. Antikörper wurden 1:500 und der BAP-Komplex 1:1000 verdünnt eingesetzt (alle Verdünnungen in Puffer B). Detektion über Chlornaphthol.

A) 1. Antikörper: Anti-Akrosin (Schaf) 1:2400; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Schaf-IgG)-IgGs. B) 1. Antikörper: Anti-Akrosin-Inhibitor I (Kaninchen); 1:1000; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs. C) 1. Antikörper: Anti-Akrosin-Inhibitor II (Kaninchen); 1:1000; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs. D) 1. Antikörper: Anti-Ovalbumin (Kaninchen); 1:5000; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs. E.) 1. Antikörper: Anti-C₁-Inhibitor (Kaninchen); 1:1000; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs;

Die Klone reagierten im Plaque-lift-Test mit Antikörpern gegen Eberakrosin stark positiv, zeigten jedoch keine Reaktion mit den übrigen vier Antikörpern (Abb. 16.). Zur weite-

ren Spezifizierung wurden diese Klone mit immunselektierten Antikörpern gegen Eberakrosin aus Kaninchen, Anti-(Human-IgG)-IgG, Anti-Human-Albumin-IgG und monoklonalen Antikörpern gegen Eberakrosin untersucht. II-9 zeigte als einziger Klon eine positive Reaktion mit den monoklonalen Antikörpern (Abb.17.B). I-3 und II-12 verloren ihre Infektiosität, weshalb sie nicht weiter untersucht werden konnten. Die DNA der verbleibenden Klone wurde der Eco RI-Restriktionsanalyse unterzogen.

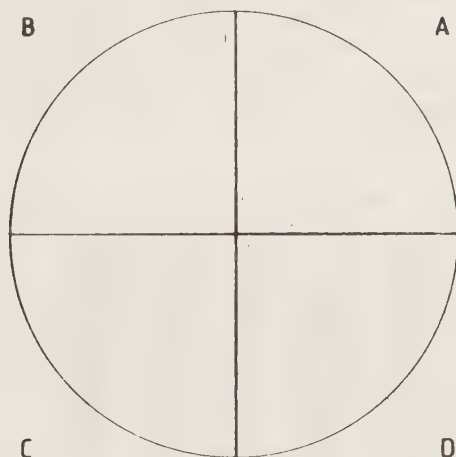


Abb.17. Ergebnisse der 2. Spezifitätstestrunde

Hier ist die Detektion des Klon AII-9 mit monoklonalen Antikörpern gezeigt. Die Reaktionsbedingungen entsprechen denen, die unter Abb. 16. aufgeführt sind.

A) 1. Antikörper: Anti-Akrosin (Schaf) 1:2400; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Schaf-IgG)-IgGs. B) 1. Antikörper: Gemisch der monoklonalen Antikörper (Maus): BAK II (1:200) BAK III (1:30) BAK IV (1:50); 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Maus-IgG)-IgGs 1:200. C) ohne 1. Antikörper; 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs. D) 1. Antikörper: Anti-Akrosin (Kaninchen) 1:1000 2. Antikörper: biotinylierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgGs;

Zur Analyse der inserierten DNA wurde die Phagen-DNA der immunologisch ausgetesteten Klone dargestellt. In der Regel konnten pro Präparation ca. 1 µg rekombinanter DNA (ca. 22 pmol) gewonnen werden, was einer Menge an inserierter DNA von 15 ng (600 bp-Fragment) bis 40 ng (1700 bp-Fragment) entspricht. Zur Freisetzung der Fremd-DNA und gleichzeitiger Hydrolyse der kontaminierenden RNA wurde die rekombinante DNA mit Eco RI und RNase A 1 bis 2 h inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz erhitzt (70°C) und auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert. Als Marker-DNA wurden Hae III-geschnittener Phage x-174 und Eco RI gespaltenen Lambda-Wildtyp eingesetzt.

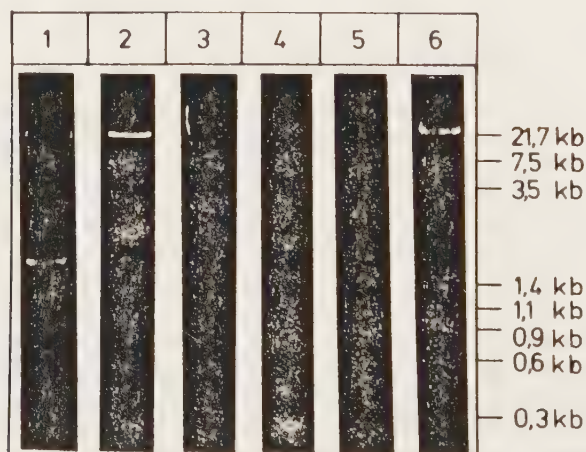


Abb.18. Bestimmung der Insertionsgrößen verschiedener Lambda-Klone durch Eco RI-Verdau und anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese. Pro Ansatz wurden ca. 1 µg DNA und 3 U Restriktionsenzym eingesetzt.

Linie 1: Klon I-2/Eco RI-gespalten. Linie 2: Klon I-4/Eco RI-gespalten. Linie 3: Klon II-5/Eco RI-gespalten. Linie 4: Klon II-8/Eco RI-gespalten. Linie 5: Klon II-9/Eco RI-gespalten. Linie 6: Klon II-10/Eco RI-gespalten.

Es zeigte sich, daß Klon I-2 eine Insertion von 1,6 kb trug, während Klon II-9 eine Insertion von 2,6 kb mit zwei internen Eco RI-Schnittstellen hatte, sodaß drei kleinere Fragmente der Größen 600, 800 und 1100 Basen erhalten wurden. Die Klone II-8 und II-10 hatten keine Insertion, während das Fragment von II-5 mit 0,2 kbb für analytische Zwecke zu klein war. I-2 und I-4 hatten gleich große Fremd-DNA inseriert, weshalb davon ausgegangen wurde, daß es sich bei beiden um denselben Klon handelte. Deshalb wurden im folgenden die Klone I-2 und II-9 näher analysiert.

D. 3.4. Ligation von isolierten cDNA-Fragmenten mit M13

Zur Sequenzierung der cDNA-Fragmente aus Klon I-2 bzw. II-9 wurden die entsprechenden Eco RI-Fragmente von 0,6 - 1,7 kb sowie ein BamH I/Hind III-Fragment (von 800 bp aus II-9, siehe oben) durch präparative Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert. Dann wurde jedes Fragment einzeln in die M13-Vektoren vom Typ mp 18 bzw. mp 19 kloniert, die sich lediglich durch die Orientierung der multiplen Klonierungssequenz unterscheiden. Nach Transformation kann über die Farbreaktion von X-Gal zwischen rekombinanten und revertanten M13-Klonen unterschieden werden: Der nicht-infizierte JM 103-Stamm ist Galaktose-defizient; er exprimiert eine aufgrund des fehlenden N-Terminus inaktive Galaktosidase. Die zur Komplementation nötigen 30 Aminosäuren dieses N-terminalen Peptids liefert der von Messing modifizierte M13 Phage, sodaß nach Infektion von JM 103 mit M13 eine funktionelle Galaktosidase exprimiert wird, die durch Spaltung von X-Gal infizierte Kolonien blau anfärbt. Im Gen, das für die fehlenden Aminosäuren codiert, sitzt die multiple Klonierungsstelle, sodaß darin eingebaute Fremd-DNA das Genprodukt für die Komplementation unbrauchbar macht. Die Infektion mit rekombinanten M13-Phagen liefert aufgrund einer inaktiven Galaktosidase also farblose Kolonien, während "blaue" Kolonien revertante, ohne Fremd-DNA religierte M13-DNA enthalten. Die Transformationsraten für M13-Wildtyp lagen in der Größenordnung von $0,8 - 1,6 \times 10^6$ (74 % des Literaturwertes). Rekombinante M13-Klone lieferten entsprechend schlechtere Transformationsausbeuten: 0,1 - 0,3 % bzw. 8,4 - 25 %

beim forcierten Klonieren (vgl. Tab.3.) Die Ligation der Bam/Hind-Fragmente (forciertes Klonieren) steigerte die Ligationsraten um den Faktor 100, da der mit zwei verschiedenen Enzymen geschnittene Vektor unterschiedliche Endsequenzen besitzt und somit über diese miteinander nicht-kompatiblen Enden nicht mehr religieren kann.

Tab.3. Übersicht der einzelnen M13-Klone mit ihren Insertionen

Klon	I-2	II-9-1	II-9-8	II-9-6	H/B	B/H
Fragmentgröße (in kB)	1,6	1,0	0,8	0,6	je	0,8
Herkunft	I-2	II-9	II-9	II-9	je	II-9
M13-Vektor	mp18	mp19	mp19	mp19	mp18	mp19
Anzahl (farbl. Plaques)	12	10	12	30	996	344
Rekombinations- rate	0,2%	0,1%	0,2%	0,3%	25%	8,4%

D. 3.5. Isolierung einzelsträngiger rekombinanter M13-DNA

Von M13-Phagen infizierte Bakterien sezernieren einzelsträngige, in Phagenpartikel verpackte DNA in das Medium, während doppelsträngige, unverpackte DNA (replikative Form) in der Zelle verbleibt. Die sezernierte DNA, die immer den sog. "+"-Strang (kodogenen Strang) darstellt, kann nach Entfernen der schützenden Phagen-Protein-Hülle direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden (vgl. Abb.19.). Um ausreichende Mengen an rekombinanter, einzelsträngiger M13-DNA zu erhalten, wurde zunächst die Anzahl der infizierten Bakterien durch Überimpfen farbloser Kolonien in eine verdünnte Übernachtskultur des nicht-infizierten E.coli-Stammes JM 103 vermehrt und dann aus dem resultierenden Kulturüberstand die einzelsträngige M13-DNA isoliert. Auf diese Weise wurden von den eingesetzten Fragmenten 8 - 12 Kolonien isoliert, propagiert und die einzelsträngige, rekombinante DNA isoliert. An-

schließlich wurde über die Sequenzierungsreaktion mit einem einzelnen Nukleotidgemisch zunächst die relative Orientierung der einzelnen cDNA-Fragmente ermittelt (T-Tracking), bevor repräsentative Klone zur vollständigen Sequenzierung eingesetzt wurden.

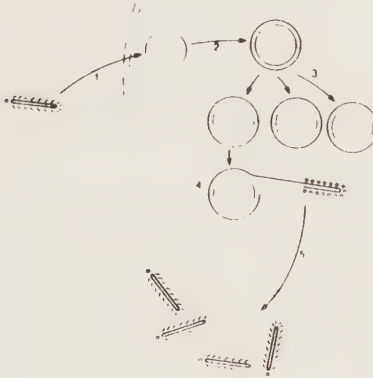


Abb.19. Lebenszyklus des Phagen M13

1.) Aufnahme der M13-DNA über die F-Pili. 2.) Übergang der kodogenen Strangs in die sog. replikative doppelsträngige Form. 3.) Replikation. 4.) Vermehren und Verpacken des kodogenen Einzelstrangs. 5.) Ausschleusen der infektiösen M13-Partikel

D. 3.6 Untersuchung des Klons AI-2

D. 3.6.1. Sequenzierung des Klons AI-2

Der erste Sequenzierungsschritt nach der Dideoxy-Terminationsmethode von Sanger erfolgte mit einem sog. universellen Primer (Oligonukleotid, das zu einer Sequenz des (+)-Strangs 32 Basen stromaufwärts von der multiplen Klonierungsstelle komplementär ist). Nach Etablierung der Primärsequenz wurde

anhand der daraus gewonnenen Sequenzdaten neuer Primer synthetisiert und für die weitere Sequenzierung eingesetzt ("primer directed sequenz analysis"). Alle Primer-Sequenzen wurden auf Ähnlichkeit mit der M13-Sequenz überprüft und nur im Fall von Sequenzhomologie kleiner als 70 % synthetisiert. Sie wurden nach Abspaltung des Trägermaterials ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Pro Sequenzreaktion konnten zwischen 250 und 400 Basen der cDNA-Sequenz gelesen werden.

Tab.4. Sequenzen der für die Sequenzierung von AI-2 eingesetzten Oligonukleotide (up = Universalprimer).
In Klammern sind die relativen Positionen der Primer in der Sequenz von AI-2 angegeben.

up: 5'- GGGTAACGCCAGGGTTT -3' (Pos. -50 - -32)
Ac4: 5'- AGCATATTAGCCAAGCTAC -3' (Pos. 211 - 230)
Ac9: 5'- AATGTCTGGCGAGGCTGAGC -3' (Pos. 605 - 624)
Ac14: 5'- CATAGTAATGCTGATCAACC -3' (Pos. 988 - 1017)
Ac15: 5'- CATCTGTAAAGACTCATCAC -3' (Pos. 924 - 933)
Ac16: 5'- CCCACCCTACAACCCAGTTG -3' (Pos. 1263 - 1282)
Ac17: 5'- ACCAGCAGTCAAGAAAAACT -3' (Pos. 1366 - 1386)

Die Sequenz wurde mit 7 Primern, inkl. "Universalprimer", vollständig analysiert. In Abb. 20 ist zur Verdeutlichung die Sequenzierungsstrategie wiedergegeben. Abb. 21 zeigt die cDNA und die dazugehörige Proteinsequenz. Bemerkenswerterweise enthält diese Sequenz keinen 5'- bzw. 3'-terminalen Bereich; dementsprechend ist auch kein Polyadenylierungssignal zu sehen.

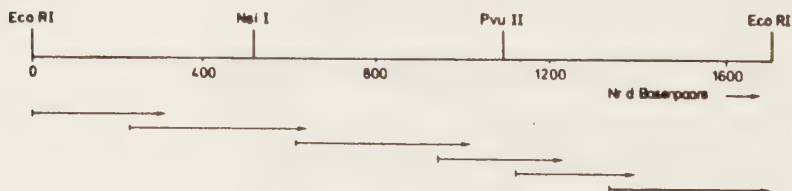


Abb.20. Sequenzierungsstrategie für Klon AI-2

Abb.21. cDNA-Sequenz und vorausgesagte Aminosäuresequenz von Klon AI-2. Die Bezifferung oberhalb der Sequenzen bezieht sich auf die Nukleotidsequenz, die unterhalb auf die entsprechende Aminosäuresequenz. Die Eco RI-Schnittstellen jeweils am Ende sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Die Sequenz beginnt mit dem 5'- bzw. Amino-Terminus.

	30	60
GAA TTC GGG CAG GAA ATG GAA GAG CCT CCG CAA GAG GCT CTG GCT GAA CCC TTG AAA CAT		
Glu Phe Gly Gln Glu Met Glu Glu Pro Pro Gln Glu Ala Leu Ala Glu Pro Leu Lys His		
	10	20
	90	120
GAA AGC CCA GCC GCT CCC TCA AGT GCT GGC CAC ACT AAG GGC CAG GAA GAA GAC GAC CAG		
Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ser Ala Gly His Thr Lys Gly Gln Glu Glu Asp Asp Gln		
	30	40
	150	180
AAG AAC CAG GCC GAA AGA AGG CAG ATA ACC ACA CTG CTC CAC AGA ATA GCT GAC CAG ACT		
Lys Asn Gln Ala Glu Arg Arg Gln Ile Thr Thr Leu Leu His Arg Ile Ala Asp Gln Thr		
	50	60
	210	240
GCC CTA AGA GTG CCT AGC CAG GCT GAA TCC AGC ATA TTT AGC CAA GCT ACC AAC GGA GTA		
Ala Leu Arg Val Pro Ser Gln Ala Glu Ser Ser Ile Phe Ser Gln Ala Thr Asn Gly Val		
	70	80
	270	300
GCT GAA CAA AAT GGG CAT AGT ACA CCT GGT CAG GCT GGC CGC AGA GCA TCC AAC CCT GCT		
Ala Glu Gln Asn Gly His Ser Thr Pro Gly Gln Ala Gly Arg Arg Ala Ser Asn Pro Ala		
	90	100
	330	360
GAT GTT TCT GAC CTT AGA GCA GAT GAT CAG GTT AAT CAA ACA CCG TCT GAA CAG ACT AAA		
Asp Val Ser Asp Leu Arg Ala Asp Asp Gln Val Asn Gln Thr Pro Ser Glu Gln Thr Lys		
	110	120
	390	420
GGC AAG GCA TCT AGC CAA GCT AAT AAT GTA CAG CAT GAA CAG AGT GAT GGT CAG GTG TCT		
Gly Lys Ala Ser Ser Gln Ala Asn Asn Val Gln His Glu Gln Ser Asp Gly Gln Val Ser		
	130	140
	450	480
GGC CTG ACG GAG GAA AGA ACT GCT GAA CAG ACT GAA CGA AGA TTA CCT ACC CAG GCT GAG		
Gly Leu Thr Glu Glu Arg Thr Ala Glu Gln Thr Glu Arg Arg Leu Pro Thr Gln Ala Glu		
	150	160

Abb.21. (Fortsetzung)

	510	540
AGA AGA ACT TCT GGG CAG ATT GAT GGT	AGA CTG GCT ATG CAT CTG ACC AGA GAG GTT CCA	
Arg Arg Thr Ser Gly Gln Ile Asp Gly	Arg Leu Ala Met His Leu Thr Arg Glu Val Pro	180
	170	
	570	600
GAC AGA CCG ACC ACA GAA TGG CAG GCC	AGT CTG AGA GAA GAG CTT CCG AGC AGA TGG ACC	
Asp Arg Pro Thr Thr Glu Trp Gln Ala	Ser Leu Arg Glu Glu Leu Pro Ser Arg Trp Thr	200
	190	
	630	660
GCA GAA TGT CTG GCG AGG CTG AGC GAA	GAA CTT CTG AGC AGA TTA CAC ACA GAT TAT CCA	
Ala Glu Cys Leu Ala Arg Leu Ser Glu	Glu Leu Leu Ser Arg Leu His Thr Asp Tyr Pro	220
	210	
	690	720
AAC TAT CTG AGA GAA GAC CTT CTG TGC	AGA TTG ACA GTG GTA TCG TCC ATC TAC CAA GTC	
Asn Tyr Leu Arg Glu Asp Leu Leu Cys	Arg Leu Thr Val Val Ser Ser Ile Tyr Gln Val	240
	230	
	750	780
CTT CTG TAC AGA TTG ACA GTG GAT CGT	CCG TAC CAT CTG ACC AAA GAC CTT CCG TAC AGA	
Leu Leu Tyr Arg Leu Thr Val Asp Arg	Pro Tyr His Leu Thr Lys Asp Leu Pro Tyr Arg	260
	250	
	810	840
TTG ACC GCA GAA TGT CAG GGA AAG TTA	GGA GAA GAA GTT CTG AGA AGA CTG ACT ACA GAT	
Leu Thr Ala Glu Cys Gln Gly Lys Leu	Gly Glu Glu Val Leu Arg Arg Leu Thr Thr	280
	270	
	870	900
TGG CTG GCC TGG CTG ACC CAG GAA CTT	CTG AGC AGA CTG ACC TCA GAT TGT ATG GCC TCG	
Trp Leu Ala Trp Leu Thr Gln Glu Leu	Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Cys Met Ala Ser	300
	290	
	930	960
TTG ACC ATG AAA CGA TCT GTA AAG ACT	CAT CAC CAA GTG TAC GGC CAA GCC ACT GAA CTA	
Leu Thr Lys Arg Ser Val Lys Thr	His His Gln Val Tyr Gly Gln Ala Thr Glu Leu	320
	310	

Abb.21. (Fortsetzung)

990	1020
GCT GAA CAC CAG GCT ATT GAC CAA GCT CAT AGT AAT GCT GAT CAA CCT CCA GTT GAC AAT	
Ala Glu His Gln Ala Ile Asp Gln Ala His Ser Asn Ala Asp Gln Pro Pro Val Asp Asn	
330	340
1050	1080
GCT CAC TAC ACT GAA TCT GAC CAG ACT GAC CAC TTA GCA GAC AGA CAA GCT AAT CAT AAA	
Ala His Tyr Thr Glu Ser Asp Gln Thr Asp His Leu Ala Asp Arg Gln Ala Asn His Lys	
350	360
1110	1140
GAC CAG CTG TCT TAC TAT GAA ACA CGT GGC CAG TCT GAA GAC AGA ATA TTT CCC CAG TTA	
Asp Gln Leu Ser Tyr Tyr Glu Thr Arg Gly Gln Ser Glu Asp Arg Ile Phe Pro Gln Leu	
370	380
1170	1200
GGC AAC AGC AAA GAG GAC AAA GAG GCT GAC TAC AGA GTA CAA CCC TGC AAA TTT GAG GAT	
Gly Asn Ser Lys Glu Asp Lys Glu Ala Asp Tyr Arg Val Gln Pro Cys Lys Phe Glu Asp	
390	400
1230	1260
AGC CAA GTA GAC CTC AAT TCC AAG CCT TCA GTT GAA ATG GAA ACT CAG AAT GCA ACC ACT	
Ser Gln Val Asp Leu Asn Ser Lys Pro Ser Val Glu Met Glu Thr Gln Asn Ala Thr Thr	
410	420
1290	1320
ATC CCA CCC TAC AAC CCA GTT GAT GCC AGA TTC ACC AGT AAC TTC CAA GCA AAA GAC CAA	
Ile Pro Pro Tyr Asn Pro Val Asp Ala Arg Phe Thr Ser Asn Phe Gln Ala Lys Asp Gln	
430	440
1350	1380
GCT CTT TTC CCA AGA CTC CCC TCC ATC TTA TCC AAA TTG AAC TAT ACC AGC AGT CAA CAA	
Ala Leu Phe Pro Arg Leu Pro Ser Ile Leu Ser Lys Leu Asn Tyr Thr Ser Ser Gln Gln	
450	460
1410	1440
AAA ACT CAA GGC ATA GTA ACC AAA TCT GAT GAA TTT TCA GAA ATT GAC CAA GGA AAG GGT	
Lys Thr Gln Ala Ile Val Thr Lys Ser Asp Glu Phe Ser Glu Ile Asp Gln Gly Lys Gly	
470	480

Abb.21. (Fortsetzung)

1470	1500
TAT CAT ATA CGC AAT CAA ACT TAT AGA AGG TTC CCT TCT ATA GTT TAT GAA GAT CCT TAC	
Tyr His Ile Arg Asn Gln Thr Tyr Arg Phe Pro Ser Ile Val Tyr Glu Asp Pro Tyr	
490	500
1530	1560
CAA GTT TCA CTC CAA TAC ATG GAA AAA CAC CAC ATT CTG CAA ATA TTC CAG CAG ATT ACT	
Gln Val Ser Leu Gln Tyr Met Glu Lys His His Ile Leu Gln Ile Phe Gln Gln Ile Thr	
510	520
1590	1620
GAA AAC TTA GTC TAT GAA AAG CCA GAG GAC CCT GAA TTT TAT GCT GTG CCA GGT ATA GAA	
Glu Asn Leu Val Tyr Glu Lys Pro Glu Asp Pro Glu Phe Tyr Ala Val Pro Gly Ile Glu	
530	540
1650	1680
TTG GAG AAA AAG AAC AAC CTT TTT ATT CTC TTT ATT GTA AAA TAC AGC ACA CAT ACA GCA	
Leu Glu Lys Lys Asn Asn Leu Phe Ile Leu Phe Ile Val Lys Tyr Ser Thr His Thr Ala	
550	560
1710	
AAG TGT ATA GAC AAA GTA CCT ACA ACT CTG <u>AAT TC</u>	
Lys Cys Ile Asp Lys Val Pro Thr Thr Leu Asn	
570	

D. 3.6.2. Vergleich mit den Proteinsequenzdaten von Eberakrosin

Im folgenden sind DNA-Sequenz-Vergleiche mit den Partialsequenzdaten von Eberakrosin nicht gezeigt, da naturgemäß die Übereinstimmung geringer als bei Proteindaten ist.

Vom Eberakrosin sind derzeit 17 Proteinfragmente mit Größen zwischen 4 und 52 Aminosäuren bekannt. Diese Peptide sind Trypsin-ähnlichen Sequenzen zuordbar, sodaß die Positionierung des N-Terminus und des aktiven Zentrums von Eberakrosin möglich war (Fock-Nüzel, 1983); der C-Terminus ist nur bruchstückhaft bekannt. Die vollständig bekannte leichte Kette ist im Proakrosin-Molekül mit dem N-Terminus des reifen Enzyms direkt verknüpft (Töpfer-Petersen & Henschen, 1988b). Diese Peptide wurden einzeln mit den gewonnenen DNA-Sequenzdaten und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz verglichen. Der Vergleich erfolgte über das Programm von MicroGenie. Die Variablen wurden so gewählt, daß mindestens zwei benachbarte Aminosäuren übereinstimmen, zwei homologe Bereiche bis zu 9 Aminosäuren entfernt sein dürfen und die Ähnlichkeit der analytischen Peptide größer als 50 % sein sollte (dies entspricht dem größtmöglichen Freiheitsgrad, den das Computerprogramm zuließ).

A	195	Leu	Pro	Ser	Arg	Trp		Thr	Ala	102				
	37	Leu	Asn	Ser	His	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	45			
		*		*			*	*						
B	499	Pro	Tyr	Gln	Val	Ser	Leu	Gln	Tyr	Met	Glu	Lys	His	His
	13	Pro	Trp	Met	Val	Ser	Leu	Gln						
		*	*						*	*	*	*	*	*
		Ile	Leu	Gln	Ile	Phe		516						
					Ile	Phe		21						
		*	*	*										
C	533	Phe	Tyr	Ala				Val	Pro	Gly	538			
	3	Phe	Gly	Ala	Asn	Glu	Val	Val	Pro	Gly	11			
		*		*	*	*	*							
D	110	Gln	Val	Asn	Gln			Thr	Pro	Ser	116			
	7	Gln	Met	Val	Gln	Leu	Gly	Thr	Pro	Ser	15			
		*	*			*	*							
E	153	Arg	Arg	Leu	Pro	Thr	Gln	Ala	Glu	Arg	Arg	162		
	4	Arg	Thr	Ser	Pro	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	Arg	13		
		*	*				*	*		*				
F	262	Thr	Ala	Glu	Cys	Gln	Gly	Lys	Leu	Gly	270			
	15	Thr			Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	21			
		*	*					*	*					
G	319	Glu	Leu	Ala	Glu	His	Gln	Ala	Ile		326			
	16	Glu	Leu	Ala	Ile	Val	Gln	Asp	Ile		23			
					*	*		*						
H	352	Leu	Ala	Asp	Arg	Gln			Ala	Asn	358			
	17	Leu	Ala	Ile	Val	Gln	Asp	Ile	Ala	Asn	25			
			*	*		*	*	*	*					
I	332	Asn	Ala	Asp	Gln	Pro			Pro	Val	338			
	22	Asn	Ser	Asp	Pro	Pro	Gln	Lys	Pro	Pro	Val	31		
		*		*		*	*	*	*	*				

Abb.22. Ähnlichkeiten zwischen der vorhergesagten Aminosäuresequenz von AI-2 (obere Zeilen) und bekannten Partialsequenzen von Eberakrosin (untere Zeilen). Die Sterne unterhalb der Sequenz geben die nicht passenden Aminosäuren bzw. Leerstellen an, die zur maximalen Homologie eingefügt wurden. Die Zahlen entsprechen den Positionen innerhalb der jeweiligen Peptidkette. Ähnlichkeit mit dem N-Terminus (A - E), mit dem reaktiven Zentrum (F) und dem C-Terminus (G - I) von Eberakrosin.

Das Peptid mit der höchsten Ähnlichkeit war ein Nonapeptid aus dem Aminoterminus von Eberakrosin, das 7 Aminosäuren über einen Bereich von 18 Aminosäuren aus AI-2 gemeinsam hatte (siehe Abb. 22.B). Die anderen Peptide von Eberakrosin zeigten keine signifikanten Sequenzhomologien.

D. 3.6.3. Vergleich mit der Aminosäurezusammensetzung von Human- und Eberakrosin

Tab.5. zeigt die Anzahl der einzelnen Aminosäuren von Eber-, Humanakrosin und dem Protein AI-2.

Tab.5. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung

Die Angaben beziehen sich auf mol Aminosäure/mol Protein; in Klammern ist der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäuren bezogen auf die Gesamtzahl von Aminosäuren angegeben; n.d., nicht bestimmt.

Amino- säure	Protein AI-2	Human- akrosin	Eberakrosin		
			leichte Kette	schwere Kette	Gesamt- molekül
Asx	57 (10,0)	31 (9,0)	3 (13,0)	23 (7,2)	25 (7,4)
Thr	45 (7,9)	19 (5,5)	1 (4,3)	19 (5,9)	20 (5,9)
Ser	44 (7,7)	26 (7,5)	1 (4,3)	18 (5,5)	18 (5,3)
Glx	101 (17,7)	31 (9,0)	2 (8,6)	27 (8,2)	27 (7,9)
Pro	32 (5,6)	31 (9,0)	1 (4,3)	36 (11,2)	37 (10,9)
Gly	20 (3,5)	38 (11,0)	3 (13,0)	32 (10,0)	34 (10,0)
Ala	42 (7,4)	27 (7,8)	1 (4,3)	19 (5,8)	20 (5,9)
Cys	6 (1,1)	8 (2,3)	2 (8,6)	6 (1,9)	8 (2,4)
Val	26 (4,6)	22 (6,4)	0 (0,0)	27 (8,4)	27 (7,9)
Met	5 (0,9)	4 (1,2)	1 (4,3)	6 (1,8)	6 (1,8)
Ile	20 (3,5)	21 (6,1)	0 (0,0)	17 (5,2)	17 (5,0)
Leu	52 (9,1)	22 (6,4)	2 (8,6)	24 (7,5)	25 (7,4)
Tyr	21 (3,7)	10 (2,9)	0 (0,0)	10 (3,0)	10 (2,6)
Phe	13 (2,3)	11 (3,2)	1 (4,3)	10 (3,1)	11 (3,2)
His	19 (3,3)	7 (2,0)	0 (0,0)	7 (2,2)	7 (2,1)
Lys	26 (4,6)	18 (5,2)	1 (4,3)	15 (4,7)	16 (4,7)
Arg	37 (6,5)	19 (5,5)	4 (17,4)	23 (7,2)	27 (7,69)
Trp	4 (0,7)	n.d.	0 (0,0)	n.d.	n.d.
Summe	571	345	23	328	385

Da Human- und Eberakrosin in der Anzahl bestimmter Aminosäuren (Cys, His, Tyr, Phe) übereinstimmen (Mindermann, 1980) wurde die Aminosäurezusammensetzung des hypothetischen Proteins berechnet und der der beiden Proteine gegenübergestellt. Weil die Aminosäurezusammensetzung naturgemäß von der Länge des Proteins abhängig ist, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil der einzelnen Aminosäuren im Gesamtprotein bestimmt.

Trotz der beschränkten Aussagekraft dieser Methode kann durch diesen Vergleich und dem Sequenzhomologievergleich ausgeschlossen werden, daß zwischen dem hypothetischen Protein und Eberakrosin bzw. Humanakrosin eine verwandtschaftliche Beziehung besteht.

D. 3.6.4. Vergleich mit anderen Proteinen

Bei der Untersuchung auf Sequenzähnlichkeiten zwischen dem hypothetischen Protein AI-2 und anderen Molekülen ergab sich, daß das hypothetische Protein eine auffallend hohe Homologie zur alpha-Kette der vierten Komponente des menschlichen Komplementsystems C4 zeigt (33 % der Aminosäuren sind in identischen Positionen).

C4 besteht aus drei Untereinheiten, die von einer cDNA codiert werden: die beta-Untereinheit (Position 1 - 660), die alpha-Untereinheit (Positionen 661 - 1431) und die gamma-Untereinheit (Positionen 1432 - 1722). Aus der alpha-Kette wird durch die Wirkung der Serinproteinase C1 zwischen den Positionen 661 und 737 ein 77 Aminosäuren umfassendes Peptid (C4a-Anaphylatoxin) herausgespalten (Moon et al., 1981). Der homologe Bereich des hypothetischen Proteins AI-2 umfaßt die Positionen 678 - 791 und reicht damit über das C-terminale Ende von C4a hinaus in den Bereich der alpha-Kette (vgl. Abb. 23.).

156	Pro	Thr	Gln	Ala	Glu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gln	Ile	Asp
678	Pro	Thr	*	Ala	Lys	Arg	Cys	Cys	*	*	*	Gln	Asp
			*		*		*		*	*	*	*	
	Gly			Arg	Leu	Ala	Met	His	Leu	Thr	Arg	Glu	Val
	Gly	Val	Thr	Arg	Leu	Pro	Met	Met	Arg	Ser	Cys	Glu	Gln
		*	*			*		*	*	*	*	*	*
	Pro	Asp	Arg	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Gln	Ala	Ser	Leu	Arg
				Arg	Ala	Ala	Arg	Val	Gln	Pro	Asp	Cys	Arg
	*	*		*	*	*	*	*		*	*	*	*
	Glu	Glu	Leu	Pro	Ser	Arg	Trp	Thr		Ala	Glu	Cys	Leu
	Glu	Pro	Phe	Leu	Ser	Cys	Cys	Gln	Phe	Ala	Glu	Ser	Leu
	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*		*
	Ala	Arg	Leu	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Thr
	Arg	Lys	Lys	Ser	Arg	Asp	Lys	Gly	Gln	Ala	Gly	Leu	Gln
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Asp	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Leu	Arg	Glu		Asp	Leu	Leu	Cys
	Arg	Ala	Leu	Glu	Ile	Leu	Gln	Glu	Glu	Asp	Leu	Ile	Asp
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Arg	Leu	Thr	Val		Val	Ser	Ser	Ile	Tyr	Gln	Val	Leu
	Glu	Asp	Asp	Ile	Pro	Val	Arg	Ser	Phe	Phe	Pro	Glu	Asn
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		Leu	Tyr	Arg	Leu		Thr	Val	Asp	Arg	Pro	Tyr	His
	Trp	Leu	Trp	Arg	Val	Glu	Thr	Val	Asp	Arg	Phe	Gln	Ile
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Leu	Thr	Lys	Asp	Leu	Pro	Tyr	Arg	Leu	Thr	Ala		Glu
	Leu	Thr	Leu	Trp	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Thr	Trp	Glu
		*	*			*	*		*	*	*	*	*
	Cys	Gln	Gly										267
	Ile	His	Gly										791
	*	*											

Abb.23. Homologie zu Anaphylatoxin; Die Sterne unterhalb der Sequenz geben die nicht passenden Aminosäuren bzw. Leerstellen an, die zur maximalen Homologie eingefügt wurden.

D. 3.6.5. Charakterisierung des hypothetischen Proteins von Klon AI-2

Für die vorhandenen Proteinsequenzdaten des Klons AI-2 wurde mit Hilfe des Programms MicroGenie ein Hydrophatite-Profil erstellt und die potentielle Sekundärstruktur des Proteins bestimmt.

D. 3.6.5.1. Hydrophatisches Profil

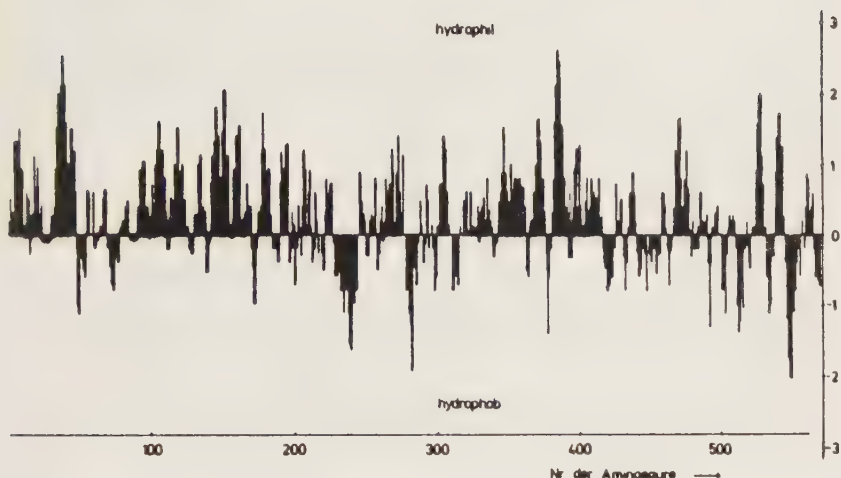


Abb.24. Hydrophathisches Profil des postulierten Proteins AI-2 nach Hopp & Woods, 1981.

Das Programm sagt einen überwiegend hydrophilen Charakter für das Protein voraus. Es gibt nur zwei größere hydrophobe Bereiche zwischen den Aminosäurepositionen 228 - 244 und zwischen 546 - 565 (vgl. Abb. 24.). Dagegen ist Eberakrosin als ein stark hydrophobes Protein bekannt (Müller-Esterl & Fritz, 1980).

D. 3.6.5.2. Sekundärstruktur des Proteins AI-2

Das hypothetische Protein ist vorwiegend alpha-helikal aufgebaut. Der längste β -Faltblattbereich (Position 214 - 264) fällt interessanterweise mit einem hydrophoben Bereich zusammen (vgl. Abb. 24. mit Abb. 25.).

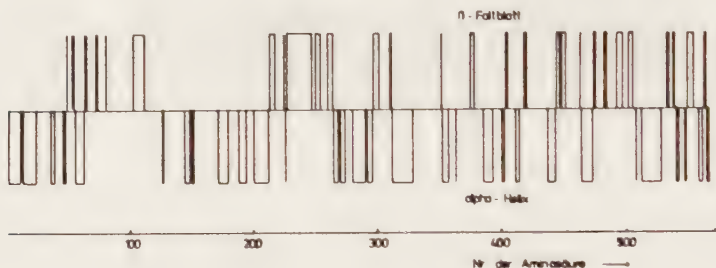


Abb.25. Berechnete Sekundärstruktur des postulierten Proteins AI-2 nach Garnier et al., 1978.

D. 3.7. Untersuchung des Klons AII-9

D. 3.7.1. Sequenzierung

Die inserierte DNA von Klon II-9 wies zwei interne Eco RI-Schnittstellen auf; dadurch entstanden bei der Eco RI-Restriktion drei Fragmente von 0,6, 0,8 und 1,1 kB, die in M13 kloniert wurden. Das Fragment von 600 Bp wurde in beiden Orientierungen in M13 eingebaut (Klon AII-9-6-1 bzw. Klon AII-9-6-2). Mit Hilfe des Universalprimers und des Primers Ac 24 konnte die komplette Sequenz der Insertion durch überlappende Sequenzierung des Strangs und Gegenstrangs ermittelt werden. Dagegen konnte das Fragment mit 800 Bp nur in einer Orientierung in M13 erhalten werden. Zu seiner vollständigen Sequenzierung wurde aufgrund der ermittelten Sequenzdaten die Primer Ac 13 und Ac 23 synthetisiert. Das

dritte Fragment hatte die Größe von 1,1 kB. Es wurde in beiden Orientierungen einkloniert: AII-9-1-1 (Gegenstrang) und AII-9-1-2. Aufgrund seiner Größe wurden zur vollständigen Sequenzierung Primer Ac 11 (für AII-9-1-1) bzw. Ac12 für (AII-9-1-2) synthetisiert (siehe Abb. 26. und Tab. 6.).

Tab.6. Sequenzen der für die Sequenzierung von AII-9 eingesetzten Oligonukleotide (up = Universalprimer). In Klammern sind die relativen Positionen der Primer in der Sequenz von AI-2 angegeben.

up: 5'- GGGTAACGCCAGGGTTT -3' (Pos. -50 - -32)
 Ac11: 5'- AATATATGTGATGCCACAGA -3' (Pos. 2313 - 2294, Gegenstrang)
 Ac12: 5'- GAAAAAAGTAGAGGAACTAC -3' (Pos. 1791 - 1810)
 Ac13: 5'- GGGTGGAGGTTATGAAGTGA -3' (Pos. 971 - 991)
 Ac23: 5'- GTGGCTTGATCTTTTCAGGAT -3' (Pos. 818 - 791, Gegenstrang)
 Ac24: 5'- GAGATGTGTAGGAACTATCA -3' (Pos. 148 - 129)
 Ac25: 5'- GAATCTAATGAAATATGCAT -3' (Pos. 501 - 520)

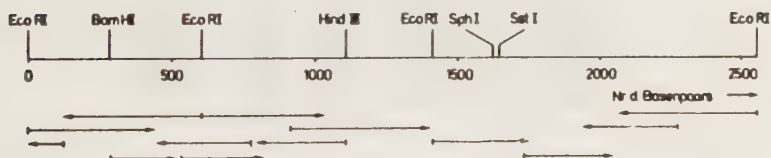


Abb.26. Sequenzierungsstrategie für Klon AII-9

D. 3.7.2. Kartierung

Durch Eco RI-Partialverdau konnten keine eindeutigen Informationen über Abfolge und Orientierung der drei Eco-Fragmente des Klons AII-9 gewonnen werden. Deshalb wurden nach Ermittlung der Sequenz der drei Fragmente mit Hilfe des Computerprogramms "MicroGenie" singuläre Endonuklease-Erken-

nungssequenzen in der DNA-Sequenz gesucht; folgende Schnittstellen wurden selektiert:

Auf dem 1,1 kB-Fragment jeweils eine Sst I- bzw. Sph I-Schnittstelle, auf dem 800 Bp-Fragment eine Hind III-Sequenz und auf dem 600 Bp-Fragment eine BamH I-Stelle. Anschließend wurde die Lambda-DNA AII-9 mit den einzelnen oder einer Kombinationen der ausgewählten Restriktionsenzyme verdaut. Als Kontrolle wurde jeweils die Lambda gt 11-Wildtyp-DNA (ohne Insertion) eingesetzt (vgl. Abb. 27).



Abb.27. Restriktionskartierung der cDNA von Klon AII-9

Die DNA von Klon AII-9 (gerade Laufliniennummern) bzw. Lambda gt11 ohne Insertion (ungerade Laufliniennummern) wurde mit Restriktionsnukleasen verdaut und die resultierenden Fragmente mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

Linien 1 + 2: Bam HI/Sst I; Linien 3 + 4: Hind III/Sst I; Linien 5 + 6: Bam HI/Hind III; Linien 7 + 8: Hind III/Sph I; Linien 9 + 10: Bam HI/Sph I; Linien 11 + 12: Sst I.

tierung überschritten. Daher wurde das Bam/Hind-Fragment durch präparative Gel-Elektrophorese isoliert und in die M13-Vektoren mp18 und mp19 umkloniert (vgl. D.3.4.). Die beiden Vektoren, die sich lediglich in der Orientierung der multiplen Klonierungsstelle unterscheiden, bauen die Fremd-DNA in einer definierten Richtung ein (gezielte Klonierung). Durch Sequenzierung des Bam/Hind-Fragments konnte die Lage des 600 Bp-Fragments zum lac z-Gen eindeutig bestimmt werden. Das Ergebnis der Sequenzierung und Kartierung ist in Abb. 29. zusammengefaßt.

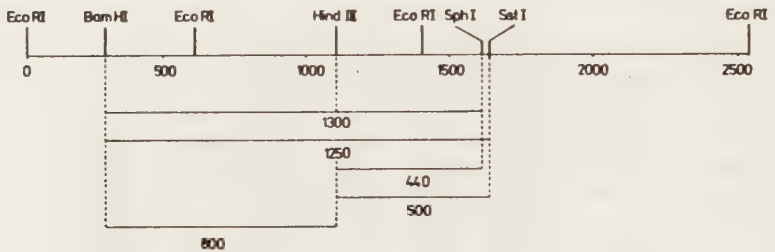


Abb.29. Ergebnis der Restriktionskartierung der cDNA von Klon AII-9

Hier ist die durch die Kartierung erhaltene Reihenfolge der drei Fragmente gezeigt, einschließlich der durch die Spaltung erhaltenen Fragmente. An die linke Eco RI-Schnittstelle schließt das lac z-Gen an.

Nach Kartierung und Sequenzierung stellte sich die cDNA, wie in Abb. 30. (obere Zeile) gezeigt, dar. Die untere Zeile zeigt die an den Leserahmen des lac z-Gen anschließende Aminosäureabfolge.

Abb.30. cDNA-Sequenz und potentielle Aminosäuresequenz von Klon AII-9. Die Bezifferung oberhalb der Sequenzen bezieht sich auf die Nukleotidsequenz, die unterhalb auf die entsprechende Aminosäuresequenz. Die Eco RI-Schnittstellen jeweils am Ende sind durch Unterstreichen hervorgehoben. Die Sequenz beginnt mit dem 5'- bzw. Amino-Terminus.

	30	60
GAA <u>TTC</u> AGT GCA TAC AAA ATC AGC <u>TTC</u> TGT TGT ATC ATC AGA <u>TTC</u> CAT <u>TTC</u> AAC <u>TTC</u> TGC		
Glu Phe Ser Ala Tyr Lys Ile Ser Phe Cys Cys Ile Ile Arg Phe His Phe Asn Phe Cys	10	20
	90	120
CGA CAA CTT <u>TTC</u> TCC TGA TTT GAG GCC CAT GCA CTC CAG <u>TTC</u> GGG AGC TAA GTC ACT TAA		
Arg Gln Leu Phe Ser *** Phe Glu Ala His Ala Leu Gln Phe Gly Ser *** Val Thr ***	30	40
	150	180
ACA CTG TGT GAT AGT TCC TAC ACA TCT CAT TAT AGT TTG TCC TGA GGG AGT CTA ACA AGT		
Thr Leu Cys Asp Ser Ser Tyr Thr Ser His Tyr Ser Leu Ser *** Gly Ser Leu Thr Ser	50	60
	210	240
TAG CAG AAA TGG AAG AAC CAC CCT TGC <u>TTC</u> CAG GAG AAA ATA TTA AAG ACA TGG CCA AAG		
*** Gln Lys Trp Lys Asn His Pro Cys Phe Gln Glu Lys Ile Leu Lys Thr Trp Pro Lys	70	80
	270	300
ATG TAA CTT ATA TAT GTC CAT TCA CTG GCG CTG TAC GAG GAA CTC TGA CTG TCA CGA ATT		
Met *** Leu Ile Tyr Val His Ser Leu Ala Leu Tyr Glu Glu Leu *** Leu Ser Arg Ile	90	100
	330	360
ATA GGT TAT ATT TCA AAA GCA TGA ACG GAT CCC CCA TTT GTT TTA GAT GCT TCC CTT GGT		
Ile Gly Tyr Ile Ser Lys Ala *** Thr Asp Pro Pro Phe Val Leu Asp Ala Ser Leu Gly	110	120
	390	420
GTG ATA AAT AGA GTA GAA AAA ATT GGT GGT GCT TCT AGT CGA GGT GAA AAT TCT TAT GGA		
Val Ile Asn Arg Val Glu Lys Ile Gly Gly Ala Ser Ser Arg Gly Glu Asn Ser Tyr Gly	130	140
	450	480
CTA GAA ACT GTG TGT AAG GAT ATT AGG AAT TTA CGA TTT GCT CAT AAA CCT GAG GGG CGG		
Leu Glu Thr Val Cys Lys Asp Ile Arg Asn Leu Arg Phe Ala His Lys Pro Glu Gly Arg	150	160

Abb.30. (Fortsetzung)

ACA AGA AGA TCC ATA TTT GAG AAT CTA ATG AAA TAT GCA TTT CCT GTC TCT AAT AAC CTG	540
Thr Arg Arg Ser Ile Phe Glu Asn Leu Met Lys Tyr Ala Phe Pro Val Ser Asn Asn Leu	180
	170
	570
CCT CTT TTT GCT TTT GAA TAC AAA GAA GTA TTC CCT GAA AAT GGG TGG AAG CTA TAT GAC	600
Pro Leu Phe Ala Phe Glu Tyr Lys Glu Val Phe Pro Glu Asn Gly Trp Lys Leu Tyr Asp	200
	190
	630
CCT CTT TTA GAG TAT AGA AGG CAG GGA ATT CCA AAT GAA AGC TGG AGA ATA ACA AAG ATA	660
Pro Leu Leu Glu Tyr Arg Arg Gln Gly Ile Pro Asn Glu Ser Trp Arg Ile Thr Lys Ile	220
	210
	690
AAT GAA CGA TAT GAA CTT TGT GAT ACA TAC CCT GCC CTC CTG GTT GTG CCA GCA AAT ATT	720
Asn Glu Arg Tyr Glu Leu Cys Asp Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Val Val Pro Ala Asn Ile	240
	230
	750
CCT GAT GAA GAA TTA AAG AGA GTG GCA TCC TTC AGA TCA AGA GGC CGT ATC CCA GTT TTA	780
Pro Asp Glu Glu Leu Lys Arg Val Ala Ser Phe Arg Ser Arg Gly Arg Ile Pro Val Leu	260
	250
	810
TCA TGG ATT CAT CCT GAA AGA TCA AGC CAC AAT CAC TGC GGT GTA GCC AGC CCA TGG TTC	840
Ser Trp Ile His Pro Glu Arg Ser Ser His Asn His Cys Gly Val Ala Ser Pro Trp Leu	280
	270
	870
GAG TGA GTG GAA AGC GAA GCA AAG AAG ATG AAA AAT ACC TTC AAG CTA TCA TGG ATT CCA	900
Glu *** Val Glu Ser Glu Ala Lys Lys Met Lys Asn Thr Phe Lys Leu Ser Trp Ile Pro	300
	290
	930
ATG CCC AGT CTC ACA AAA TCT TTA TAT TTC ATG CCC GCC CAA GTG TTA ATC CTC TTC CCA	960
Met Pro Ser Leu Thr Lys Ser Leu Tyr Leu Met Pro Gly Gln Val Leu Met Leu Leu Pro	320
	310

Abb.30. (Fortsetzung)

ACA AGG CAA AGG GTG GAG GTT ATG AAA GTG AAG ATG CCT ATC AAA ATG CTG AAC TAG TTT	990	1020
Thr Arg Gln Arg Val Glu Val Met Lys Val Lys Met Pro Ile Lys Met Leu Asn *** Phe	330	340
TCC TGG ATA TCC ACA ATA TTC ATG TTA TGA GAG AAT CAT TAC GAA AAC TTA AGG AGA TGG	1050	1080
Ser Trp Ile Ser Thr Ile Phe Met Leu *** Glu Asn His Tyr Glu Asn Leu Arg Arg Leu	350	360
TGT ACC CCA ACA TTG AGG AAA CCC ACT GGT TGT CTA ACT TGG AAT CTA CTC ATT GGC TAG	1110	1140
Cys Thr Pro Thr Leu Arg Lys Pro Thr Gly Cys Leu Thr Trp Asn Leu Leu Ile Gly ***	370	380
AAC ATA TTA AGC TTA TTC TTG CAG GGG CTC TTA GGA TTG CTG ACA AGG TAG AGT CAG GGA	1170	1200
Asn Ile Leu Ser Leu Phe Leu Gln Gly Leu Leu Gly Leu Leu Thr Arg *** Ser Gln Gly	390	400
AGA CGT CTG TGG TAG TGC ATT GCA GTG ATG GTT GGG ATC GCA CAG CTC AGC TCA CTT CCC	1230	1260
Arg Arg Leu Trp *** Cys Ile Ala Val Met Val Gly Ile Ala Gln Leu Ser Ser Leu Pro	410	420
TTG CCA TGC TCA TGT TGG ATG GAT ACT ATC GAA CCA TCC GAG GAT TTG AAG TCC TTG TGG	1290	1320
Leu Pro Cys Ser Cys Trp Met Asp Thr Ile Glu Pro Ser Glu Asp Leu Lys Ser Leu Trp	430	440
AGA AAG AAT GGC TAA GTT TTG GAC ATC GAT TTC AAC TAA GAG TTG GCC ATG GAG ATA AGA	1350	1380
Arg Lys Asn Gly *** Val Leu Asp Ile Asp Phe Asn *** Glu Leu Ala Met Glu Ile Arg	450	460
CCA TGC AGA TGC AGA CAG ATC GCC TGT TTT TCT TCA ATT TAT TGA CTG TGT CTG GCA GAT	1410	1440
Pro Cys Arg Cys Arg Gln Ile Ala Cys Phe Ser Ser Ile Tyr *** Leu Cys Leu Ala Asp	470	480

Abb.30. (Fortsetzung)

	1470		1500
GAC AGA CAG TTC TAC CGC ATT GAA TTC AAT GAG TAT TTT CTC ATT ACC ATT TTG GAC CAC			
Asp Arg Gln Phe Tyr Arg Ile Glu Phe Asn Glu Tyr Phe Leu Ile Thr Ile Leu Asp His	490		500
	1530		1560
CTA TAC AGC TGC TTA TTC GGA ACA TTC CTC TGT AAT AGT GAA CAA CAG AGA GGA AAA GAG			
Leu Tyr Ser Cys Leu Phe Gly Thr Phe Leu Cys Asn Ser Glu Gln Gln Arg Gly Lys Glu	510		520
	1590		1620
AAT CTT CCT AAA AGG ACT GTG TCA CTG TGG TCT TAC ATA AAC AGC CAG CTG GAA GAC TTC			
Asn Leu Pro Lys Arg Thr Val Ser Leu Trp Ser Tyr Ile Asn Ser Gln Leu Glu Asp Phe	530		540
	1650		1680
ACT AAT CCT CTC TAT GGG AGC TAT TCC AAT CAT GTC CTT TAT CCA GTA GCC AGC ATG CGC			
Thr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Tyr Ser Asn His Val Leu Tyr Pro Val Ala Ser Met Arg	550		560
	1710		1740
CAC CTA GAG CTC TGG GTG GGA TAT TAC ATA AGG TGG AAT CCA CGG ATG AAA CCA CAG GAA			
His Leu Glu Leu Trp Val Gly Tyr Tyr Ile Arg Trp Asn Pro Arg Met Lys Pro Gln Glu	570		580
	1770		1800
CCT ATT CAC AAC AGA TAC AAA GAA CTT CTT GCT AAA CGA GCA CAG CTT CAG AAA AAA GTA			
Pro Ile His Asn Arg Tyr Lys Glu Leu Leu Ala Lys Arg Ala Glu Leu Gln Lys Lys Val	590		600
	1830		1860
GAG GAA CTA CAG AGA GAG ATT TCT AAC CGA TCA ACC TCA TCC TCA GAG AGA GCC AGC TCT			
Glu Glu Leu Gln Arg Glu Ile Ser Asn Arg Ser Thr Ser Ser Ser Glu Arg Ala Ser Ser	610		620
	1890		1920
CCT GCA CAG TGT GTC ACT CCT GTC CAA ACT GTT GTA TAA AGG ACT GTA AGA TCA GGG GCA			
Pro Ala Gln Cys Val Thr Pro Val Gln Thr Val Val *** Arg Thr Val Arg Ser Gly Ala	630		640

Abb.30. (Fortsetzung)

1950	1980
TCA TTC TAT ACA CTC TTG ATT ACA CTG GCA GCT CTA TGA GTA GAA AGT CTT CGG AAT TTA	
Ser Phe Tyr Thr Leu Leu Ile Thr Leu Ala Ala Leu *** Val Glu Ser Leu Arg Asn Leu	
650	660
2010	2040
GAA CCC ATC TAT GAG AGA AAG TTC AGT CAC TTT ATT TAT TTT AAA TCT CTC TAG GAT GAG	
Glu Pro Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Ser His Phe Ile Tyr Phe Lys Ser Leu *** Asp Glu	
670	680
2070	2100
TTT AGA ACT GTA GCA GTG CAG GTG GCT TAA GTG AAG TAA CTC CAT ATG TAA TTA CAT GAT	
Phe Arg Thr Val Ala Val Gln Val Ala *** Val Lys *** Leu His Met *** Leu His Asp	
690	700
2130	2160
TAT GAT ACT AAT CTT TTA AGT ATC CAA AGA ATA TTA AAA TAC TTC AAT CCT GGA TTC ACA	
Tyr Asp Thr Asn Leu Leu Ser Ile Gln Arg Ile Leu Lys Tyr Phe Asn Pro Gly Phe Thr	
710	720
2190	2220
GTG GGA ACA AGT TTC TAT TAA AAG GCA AAT GCT GTT ACA AAT TTT TGG CAT CTG GTA ATA	
Val Gly Thr Ser Phe Tyr *** Lys Ala Asn Ala Val Thr Asn Phe Trp His Leu Val Ile	
730	740
2250	2280
TTA AAA CCA TTT TAG AAA TAC ACT CTG TGC TCA CTG TGC AGA GGA ACA TCA GTT TTC AAA	
Leu Lys Pro Phe *** Lys Tyr Thr Leu Cys Ser Leu Cys Arg Gly Thr Ser Val Phe Lys	
750	760
2310	2340
CCA ACA CTG AAA TTC TGT GGC ATC ACA TAT ATT GGG CCT TGA TGT CAT GAC AGA TCA AAA	
Pro Thr Leu Lys Phe Cys Gly Ile Thr Tyr Ile Gly Pro *** Cys His Asp Arg Ser Lys	
770	780
2370	2400
TCA TTT GAT ATC CCT TTC TCC ATT CTA GGT TTT TCT TTT TTT CAG TAA CTG ATT TAC CTT	
Ser Phe Asp Ile Pro Phe Ser Ile Leu Gly Phe Ser Phe Phe Gln *** Leu Ile Tyr Leu	
790	800

Abb.30. (Fortsetzung)

2430	2460
GAT CAC TTT TCA ACT TCC ATA TTC TTC ATA TAG TAA AAG GCA AAG TGT TGA AGA TAC TAC	
Asp His Phe Ser Thr Ser Ile Phe Phe Ile *** ** Lys Ala Lys Cys *** Arg Tyr Tyr	
810	820
2490	2520
GGT GTG GTA GTA GTT GAA AAT TAT TGC CGT CAT TAT TTA CAT ACT TAA GAC ATA TTA GCA	
Gly Val Val Val Val Glu Asn Tyr Cys Arg His Tyr Leu His Thr *** Asp Ile Leu Ala	
830	840
2550	2580
AGT GAT CCA AAA TGG GAG GCC TTA TAG ATG TGC TTG GGG GAA AAT GAA GGG GAG AAA GTA	
Ser Asp Pro Lys Trp Glu Ala Leu *** Met Cys Leu Gly Glu Asn Glu Gly Glu Lys Val	
850	860
GCC ATA CAG GAG TTC AAA <u>GAA TTC</u>	
Ala Ile Gln Glu Phe Lys Glu Phe	

D. 3.7.3. Vergleich mit den Sequenzdaten von Eberakrosin

Der offene Leserahmen der an die Galaktosidase anschließenden DNA-Sequenz wird nach 75 bp durch ein Stoppcodon unterbrochen. Diese Analyse stimmt mit dem aus dem Immunoprint erhaltenen Ergebnis überein. Das von der DNA-Sequenz abgeleitete 25 Aminosäuren lange Peptid wurde mit den bekannten Partialsequenzen von Eberakrosin verglichen. Für den Vergleich wurden dieselben Variablen des Programms "MicroGenie" gewählt wie für Klon AI-2. Diese 25 Aminosäuren zeigen geringfügige Ähnlichkeit mit einer Partialsequenz von Eberakrosin, die das reaktive Zentrum enthält (vier Aminosäuren eines Nonapeptids sind identisch; siehe Abb. 31 A). Die Übereinstimmung endet aber drei Aminosäuren vor Ser (195). Eine zweite, größere Ähnlichkeit besteht mit der leichten Kette der Protease (42 % der Aminosäuren in identischen Positionen, vgl. Abb. 31.B).

A	5	Tyr				Lys	Ile	Ser	Phe	Cys	10			
	8	Tyr	Pro	Arg	Gly	Lys	Ile	Asp	Thr	Cys	16			
			*	*	*			*	*					
B	11	Cys	Ile	Ile	Arg	Phe	His	Phe	Asn	Phe	Cys	Arg	Gln	22
	10	Cys	Gly	Leu	Arg	Phe						Arg	Gln	16
			*	*			*	*	*	*	*			
C	13	Ile	Arg	Phe	His	Phe	Asn				18			
	20	Ile					Phe	Asn			22			
			*	*	*									

Abb.31. Vergleich der vorhergesagten Proteinsequenz von AII-9 (obere Zeile) mit den bekannten Partialsequenzen von Eberakrosin (untere Zeile). Die Zahlen geben die Positionen innerhalb der jeweiligen Peptidkette an. Die Sterne unterhalb der Sequenz geben die nicht passenden Aminosäuren bzw. Leerstellen an, die zur maximalen Homologie eingefügt wurden.

A) Ähnlichkeit mit dem Peptid aus dem reaktiven Zentrum; B) Ähnlichkeit mit der leichten Kette; C) Ähnlichkeit mit dem Peptid aus dem C-Terminus

D. 3.7.4. Vergleich mit anderen Proteinen

Ein Vergleich mit anderen Proteinen aus der Datenbank von MicroGenie zeigt keine signifikante Ähnlichkeit mit der vorhergesagten kodierenden Sequenz des Klons AII-9. Jedoch besteht Verwandtschaft zwischen der vorhergesagten Aminosäuresequenz des 800 Bp großen Fragments und dem Vorläufer des sekretorischen Proteins IV aus seminalen Vesikeln der Ratte. Die seminalen Vesikel produzieren unter hormonellem Einfluß von Testosteron eine Gruppe kleiner basischer Moleküle (Protein SVS IV - V). Das Protein IV umfaßt 90 Aminosäuren exklusive eines 21 Aminosäure langen Signalpeptids (Harris et al., 1983). Die Übereinstimmung mit der vorausgesagten Sequenz beginnt im Signalpeptid (Pos 5) und endet 24 Aminosäuren vor dem C-Terminus (32 % identische Positionen, siehe Abb. 32.).

```

384 Ser Leu Phe Gln Gly Leu Leu Gly Leu Leu Thr Arg
5 Ser Leu Phe Leu Cys Ser Leu Leu Leu Val Thr Gly
      * * * * *

Ser Gln Gly Arg Arg Leu Trp Cys Ile Ala Val Met
Ala Ile Gly Arg Lys Thr Lys Glu Lys Tyr Ser Gln Ser
      * * * * *

Val Gly Ile Ala Gln Leu Ser Ser Leu Pro Leu Pro Cys
Glu Glu Val Val Ser Glu Ser Phe Ala Ser Gly Pro Ser
      * * * * *

Ser Cys Trp Met Asp Thr Ile Glu Pro Ser Glu Asp Leu
Ser Gly Ser Ser Asp Asp Glu Leu Val Arg Asp
      * * * * *

Lys Ser Leu Trp Arg Lys Asn Gly Val Leu Gly His
Lys Pro Tyr Gly Pro Lys Val Ser Gly Gly
      * * * * *

Asp Phe Asn Glu Leu Ala Met Glu Ile Arg Pro Cys
Ser Phe Gly Glu Glu Ala Ser Glu Glu Ile Ser Ser Arg
      * * * * *

Arg Cys Arg Gln Ile Ala Cys Phe Ser Ser 472
Arg Ser Lys His Ile Ser Arg Ser Ser 87
      * * * * *

```

Abb.32. Ähnlichkeit der Klons AII-9-8 zum sekretorischen Protein IV aus seminalen Vesikeln der Ratte. Die Sterne unterhalb der Sequenz geben die nicht passenden Aminosäuren bzw. Leerstellen an, die zur maximalen Homologie eingefügt wurden.

D. 3.7.5. Isolierung von Fusionsproteinen

Unter dem Begriff Fusionsprotein versteht man ein Hybridprotein, das - bedingt durch die genomische Struktur der rekombinanten DNA - Vektor- und Fremdanteile trägt. Voraussetzung für die Bildung von Fusionsprotein ist, daß die Fremd-DNA ohne Verschiebung des Leserahmens eingebaut wird. Zur Isolierung des Fusionsproteins ist es wichtig, daß Bakterienzellen effizient von rekombinanten Lambda-Phagen infiziert werden. Von daher wurden Phagen in großem numerischen Überschuß gegenüber den Bakterienzellen eingesetzt (2×10^8 Phagen/ 7×10^5 Zellen des E.coli-Stammes Y1089) und das Inkubationsvolumen minimiert (20 ul). Die Infektion wurde 20 min bei 28°C durchgeführt. Aus den infizierten, sog. lysoge-

nen Bakterienstämmen wurde dann in größerem Maßstab nach IPTG-Induktion Protein isoliert und in der SDS-Elektrophorese untersucht. Die Bande für β -Galaktosidase bei 110 kDa, aus Lambda gt11 (Wildtyp), ist bei den rekombinanten Phagen zu höheren Molekulargewichten verschoben: Ova-11 produziert ein Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 160 kDa. Klon II-9 weist eine Proteinbande bei Mr 115 kDa auf, die seinem Fusionsprotein entsprechen könnte. Von I-2 und Ki-17 ist keine Bande, die für das Fusionsprotein in Frage käme, sichtbar (siehe Abb.33.)

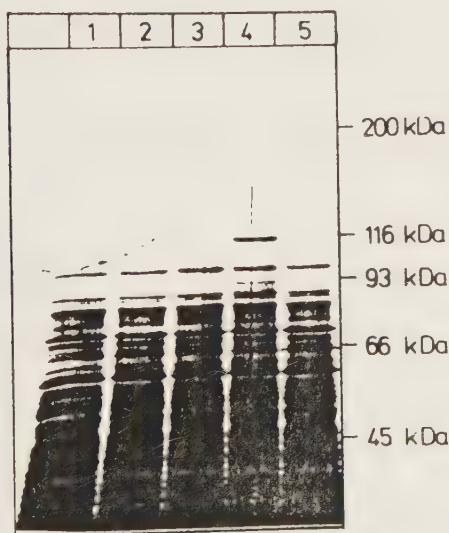


Abb.33. SDS-elektrophoretische Analyse der Fusionsproteine der Klone AI-2 und AII-9
5 - 10 % SDS-Gradienten-Gel; Proben mit 5 % DTT reduziert; Auftrag von bakteriellem Protein aus ca. 4×10^8 Zellen.
1: AII-9; 2: AI-2; 3: Ova 11; 4: Lambda gt 11-DNA ohne Insertion; 5: Ki-17

Als Kontrollen wurde Lambda gt 11-Wildtyp, Ki-17 (Lambda gt11 mit einem Teil des Kininogens-Gens und Ova-11 (ein Ovalbumin produzierender Lambda gt 11-Phage) eingesetzt. Für den Klon I-2 konnten 30 %, für den Klon II-9 66 %, für Lambda-Wildtyp 17 %, für Ki-17 26 % und für Ova-11 10 % lysogene Kolonien erhalten werden.

D. 3.7.6. Western-Blotting

Das Zellprotein der lysogenen Stämme wurde auf einem 5-10 % Acrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Immundetektion erfolgte wie bei den Plaquelift-Tests, jedoch wurden zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen die Antikörper bzw. der BAP-Komplex mit dem siebenfachen Volumen E.coli-Proteine eine Stunde bei 4°C präabsorbiert.

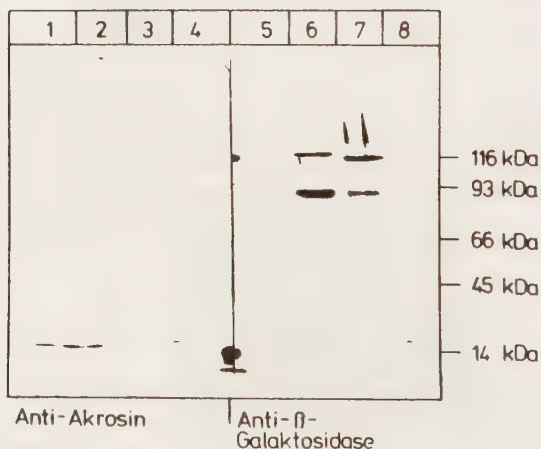


Abb.34. Immunoprinting der Fusionsproteine der Klone AI-2, AII-9, Ova-11 und Lambda gt11.

Linien 1 mit 4: 1.) Anti-Akrosin-Antikörper (Schaf); 16 h 2.) biotinylierte Anti-(Schaf-IgG)-IgGs; 3 h.
 Linien 5 mit 8: 1.) Anti-β-Galaktosidase-Antiserum (Kaninchen) 16 h ; 2. Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG 3 h
 (je 1:500) BAP-Komplex (1:1000) 30 min; Substrat: Chlornaphthol. 1:AI-2; 2: AII-9; 3: Lambda gt11; 4: Ova-11; 5: AI-2; 6: AII-9; 7: Lambda gt11; 8: Ova-11

Mit Anti- β -Gal-Antikörpern (als Erstantikörper) wird sowohl β -Gal von Lambda gt 11 wie auch der β -Gal-Anteil des Fusionsproteins von Klon II-9 erkannt. Dagegen wird mit Anti-Akrosin-Antikörpern nur die Bande des rekombinanten Proteins angefärbt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Klon II-9 für ein Fusionsprotein kodiert, das aus β -Galaktosidase von 110 kDa und einem Fremdprotein von ca. 5 kDa besteht, wobei letzteres von Anti-Akrosin-Antikörpern erkannt wird.

Die Spermienproteinase Akrosin, eine Trypsin-ähnliche Endopeptidase, nimmt eine zentrale Funktion bei der Befruchtung ein, indem sie die proteinhaltigen äußeren Eihüllen digestiert, damit dem Spermatozoon eine Durchdringung dieser Barrieren ermöglicht und damit letztlich die Fusion der Gameten bahnt. Die molekulare Struktur von Akrosin ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt.

Für Eberakrosin wurden Molekülmassen zwischen 25 und 55 kDa beschrieben. Gesichert zu sein scheint, daß Akrosin in einer inaktiven Proenzymform synthetisiert wird. Das Molekulargewicht dieser Vorstufe liegt zwischen 53 und 55 kDa (Siegel et al., 1987); eine Differenz, die vermutlich von unterschiedlicher Glykosylierung herrührt. Das Proenzym wird durch eine singuläre Spaltung nahe dem Aminoterminal des Proenzyms aktiviert (Töpfer-Petersen & Henschen, 1988b). Dabei entsteht eine leichte Kette von 23 Aminosäuren, die eine typische N-Glykosylierungsstelle vom Typ Asn-Xaa-Thr trägt, und eine schwere von ca. 450 Aminosäuren, die über 2 Disulfidbrücken mit der leichten Kette verbunden bleibt. Weitere proteolytische Prozessierung führt durch Abspaltung eines C-terminalen, Prolin-reichen Peptids zu einer 38 kDa-Form, die dann weiter zu einer für Serinproteasen typischen Größe von 25 kDa abgebaut wird (Fock-Nüzel, 1984). Über den molekularen Ablauf dieser Prozessierungskette ist bisher wenig bekannt.

Von humanem Akrosin sind wenig gesicherte Daten vorhanden. Allerdings scheinen große strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Human- und Eberakrosin zu bestehen. Hinweise dazu stammen aus der immunologischen Kreuzreaktion (Schill et al., 1975; Kaufmann et al., 1987) und der Aminosäurezusammensetzung (Mindermann, 1981). Die Größe von Humanakrosin wird von Gilboa et al. (1973) zwischen 75 und 77 kDa, von Kaufmann et al. (1987) mit 55 kDa und von Tobias & Schumacher (1977) mit 44 kDa angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die komplette Primärsequenz von Akrosin anhand seiner cDNA-Sequenz aufzuklären. Ausgangspunkt dafür war die zellfreie Translation von testikulärer mRNA und die Analyse von Akrosinvorstufen aus dem Translationsgemisch durch Immunpräzipitation.

Die zellfreie Translation wurde mit Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten durchgeführt, das mit testikulärer mRNA (aus Eber) supplementiert wurde. Die Präzipitation wurde in zwei Varianten ausgeführt:

- 1.) Verwendung von polyklonalem Antiserum gegen Eberakrosin und Isolierung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Protein A-Sepharose.
- 2.) Die Fällung mit immunselektierten Antikörpern gegen Eberakrosin, die zuvor an Sepharose gekoppelt worden waren.

Die Validität der Protein A-Technik wurde mit placentaler mRNA und Antikörpern gegen placentales Lactogen bestätigt; bei der Verwendung von testikulärer mRNA und Antiserum gegen Akrosin konnten allerdings keine spezifischen Immunpräzipitate erhalten werden. Dagegen wurden mit der zweiten Methode (i.e. immobilisierte Antikörper) spezifische Präzipitate gefunden. Im SDS-Gel lieferte dieses Immunpräzipitat zwei Banden mit unterschiedlicher Intensität; ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von 46 kDa kommt in ca. zehnfachem Überschuß gegenüber einem 25 kDa-Protein vor. Diese Proteinbanden erwiesen sich als spezifisch für testikuläre Translationsgemische, da sie bei Verwendung von placentaler mRNA nicht nachgewiesen werden konnten. Beide Proteine ließen sich durch Zugabe von nichtmarkiertem Akrosin vom Antikörper verdrängen, wie durch das Verschwinden beider Banden im SDS-Gel gezeigt werden konnte. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu erwägen, daß die 46 kDa-Form in der Tat Proakrosin darstellen könnte, das unter den Bedingungen des Experiments nicht glykosyliert ist und von daher ein apparentes Molekulargewicht besitzt, das etwas kleiner als das von glykosyliertem Proakrosin (55 kDa) ist. Für die 25 kDa-Form sind drei Erklärungen denkbar: zum einen könnte es sich um ein unerwünschtes proteolytisches Abbauprodukt von Proakrosin handeln; allerdings wurden keine anderen Proteolyseprodukte (z.B. mit 21 kDa) gefunden. Als weitere Möglichkeit kommt in Betracht, daß die 25 kDa-Form ein mit Akrosin assoziiertes Protein darstellt, das in deutlich geringeren Mengen als Akrosin vorkommt (Polakoski & Parrish, 1977). Schließlich könnten zwei Typen von Akrosin-mRNA vorkommen, die für Produkte von 46 bzw. 25 kDa kodieren; für diese Hypothese gibt es allerdings keine weiteren Anhalts-

punkte. Berruti et al. (1986) erhielten durch Immunpräzipitation im SDS-Gel eine singuläre Proteinbande mit apparentem Molekulargewicht von 55 kDa. Allerdings verwandten sie epididymale mRNA und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, testikuläre mRNA. Dieser Sachverhalt könnte für das Fehlen der 25 kDa-Bande verantwortlich sein.

E. 2. Sichten der cDNA-Bank

Es wurden insgesamt 7×10^5 Rekombinanten einer testikulären cDNA-Bank in Lambda gt 11 getestet. In der ersten Runde konnten aus 2×10^5 Rekombinanten drei Klone, in der zweiten aus 5×10^5 Rekombinanten weitere 14 Klone erhalten werden, sodaß also insgesamt 17 Primärklone zur Analyse zur Verfügung standen. Nach Winnacker (1985) werden pro menschlicher Zelle ca. 50.000 verschiedene mRNAs synthetisiert. Aus 7×10^5 Rekombinanten könnte man also 2 identische Klone erhalten, wenn man von der vereinfachenden Voraussetzung ausgeht, daß alle mRNAs zu gleichen Teilen vorliegen; dabei ist zu berücksichtigen, daß nur jeder 6. Klon für ein korrektes Expressionsprodukt kodiert. Die Zahl von 17 Primärklonen steht daher in befriedigender Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen. Nach erfolgter Spezifitätsprüfung wurden die Klone I-2 und II-9 zur Sequenzanalyse ausgewählt.

E. 2.1. Klon AI-2

Der Klon I-2 hat eine Insertion mit einer Länge von 1713 Bp. Die Sequenz wurde in sieben Teilschritten nach Umklonieren in den Sequenzierungsvektor M13 mp18 bestimmt. Da die Sequenz weder ein Polyadenylierungssignal noch einen poly-A⁺-Schwanz enthält, ist es denkbar, daß der 5'- bzw. der 3'-Terminus bei der Klonierung verlorengegangen ist (in diesem Fall enthielte der codierende Bereich Eco RI-Erkennungssequenzen). Auffällig ist aber ein repetitiver Bereich zwischen Position 400 und 900. Es handelt sich dabei um 20 Bp-große Fragmente, die siebenmal wiederholt werden (siehe Tab. 8.). Da diesem Gen keine Funktion zugeschrieben werden kann, ist diese interne Genmultiplikation schwer zu inter-

pretieren. Die Tatsache, daß diese DNA aus einer cDNA-Bank gewonnen wurde, widerspricht der Vermutung, daß es sich bei diesen repetitiven Sequenzen um Satelliten-DNA handelt, die bekanntlich im Heterochromatin, also in nicht-transkribierten Regionen des Chromosoms zu finden ist (Lewin, 1985). Möglicherweise sind diese Sequenzen verantwortlich dafür, daß diese DNA nur in einer Orientierung eingebaut werden konnte, was die Sequenzanalyse erheblich erschwerte (Wyman et al., 1985).

Tab.8. Repetitive Sequenz; von links nach rechts in 3'-Richtung notiert

484	-	AAGAAC	TCTGGG	CAGATT	GAT	-	505
579	-	AAGAGC	TCCGAG	CAGATG	GAC	-	599
626	-	AAGAAC	TCTGAG	CAGATT	AC	-	646
674	-	AAGAC	CTTCTGTG	CAGATT	GAC	-	695
716	-	AAGTC	CTTCTGTAC	AGATT	GAC	-	738
763	-	AAGAC	CTTCCGTAC	AGATT	GAC	-	785
812	-	AAGAAG	TTCTGAGA	AAGACT	GAC	-	833
864	-	AA	CTTCTGAG	CAGACT	GAC	-	881

Durch Computeranalyse kann dieser DNA ein offener Leserahmen von 571 Aminosäuren zugeordnet werden. Das dazugehörige Protein besitzt die für Serinproteinasen übliche Triade des aktiven Zentrums: Histidin (Position 252), Asparagin (Position 296) und Serin (Position 383), mit den für Trypsin-ähnlichen Enzymen typischen "Abstand" von 44 (45) Aminosäuren zwischen His und Asp bzw. 87 (93) Aminosäuren zwischen Asp und Ser. Es besteht also prinzipiell die Möglichkeit, daß Klon AI-2 für eine Proteinase kodiert, obgleich Homologien mit bekannten Serinproteinasen in anderen Teilen der vorausgesagten Proteinsequenz kaum gefunden wurden. Ein Vergleich dieser Sequenz mit den derzeit bekanntesten 17 Partialsequenzen von Eberakrosin brachte kein Ergebnis, ebenso war die Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung des hypothetischen Proteins AI-2 mit der von Human- bzw. Eberakrosin erfolglos.

Dagegen zeigte der Vergleich mit anderen bekannten Proteinen eine auffallend hohe Homologie zu C4a Anaphylatoxin, das Bestandteil der vierten Komponente (C4) des menschlichen Komplementssystems ist. (33 % der Aminosäuren sind in identi-

schen Positionen).

Vom C4a Anaphylatoxin sind diverse Eigenschaften bekannt (Belt et al., 1984):

a) spasmogene Wirkung

b) Desensibilisierung von glattem Muskelgewebe

c) Erhöhung der vaskulären Permeabilität der Haut

d) Kontraktion des isolierten Krummdarms aus Meerschweinchen

Möglicherweise sind diese Daten ein erster Hinweis auf Protein(e) mit für den testikulären und genitalen Bereich bisher fremden Funktionen.

Auch das mit Hilfe des Programms "MicroGenie" erstellte Hydraphathieprofil unterstützt obiges Ergebnis, für das ein sezerniertes hydrophiles Protein postuliert werden muß.

Abschließend läßt sich sagen, daß das Protein aus Klon AI-2 zwar keine Ähnlichkeit zu Eberakrosin zeigt, jedoch durch seine Ähnlichkeit mit C4a den artifiziellen Charakter verliert.

E. 2.2.

Klon AII-9

Der zweite Klon, mit einer Gesamtlänge von 2,5 kB, wurde wegen zweier interner Eco RI-Schnittstellen in drei Fragmenten (600, 800 und 1100 Bp) erhalten. Die 5'-3'-Direktionalität (und damit die Abfolge) dieser Fragmente im Original-Lambda-Klon wurde über Restriktionskartierung und forcierte Klonierung ermittelt. Das Fragment von 600 Bp liegt am weitesten 5'-terminal und schließt unmittelbar an das lac z-Gen des Lambda-Phagen an, gefolgt vom Fragment mit 800 Bp und dem mit 1100 Bp. Die entsprechende cDNA (AII-9) konnte in Bakterien (Y1089) in größeren Mengen zur Expression gebracht werden, sodaß das entsprechende Fusionsprotein, ein Hybrid aus der bakteriellen β -Galaktosidase und dem eukaryontischen Fremdprotein, detektierbar war. Im SDS-Gel und im Immunoprinting ist eine leichte Verschiebung der Bande des Fusionsproteins zu höheren Molekulargewichten gegenüber der unfusionierten β -Galaktosidase zu sehen (Differenz = 4 - 5 kDa). Besonders gut ist dieser Unterschied im entsprechenden Western-Blotting/Immunoprinting zu erkennen, wenn mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase detektiert wurde. Darüberhinaus reagierte das Fusionsprotein mit Anti-Akrosin-Antikörpern, während β -Galaktosidase selbst nicht detektiert wurde. Nach Restriktionskartierung, Sequenzierung und Immunoprint-Analyse kann man davon ausgehen, daß der Bereich,

der für den Fremdproteinanteil (apparentes Molekulargewicht ca. 4 - 5 kDa) des Fusionsproteins codiert, auf dem 600 Bp großen Fragment liegt. Laut Sequenzdaten wird der offene Leserahmen des β -Gal-Gens um 75 Bp in 3'-Richtung verlängert, bevor ein Stopp-Codon die Translation unterbricht. Demnach besteht der Fremdproteinanteil aus 25 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 2,8 kDa, was in Übereinstimmung mit der elektrophoretisch ermittelten Molekulargewichtsdifferenz steht.

Der Vergleich mit den Partialsequenzen von Eberakrosin brachte keinen Aufschluß, da keine signifikante Übereinstimmung zwischen der kodierenden Sequenz von Klon AII-9 mit der Spermienproteinase zu finden waren. Da aber über den C-terminalen Bereich des Akrosins noch keine verlässlichen Sequenzdaten vorliegen, ist es denkbar, daß diese DNA-Sequenz den C-Terminus der Proteinase codiert. Dagegen spricht auch nicht, daß in den weiter 3'-terminal gelegenen Bereichen der cDNA kein Polyadenylierungssignal zu finden ist, da es möglich ist, daß die beiden anderen Fragmente von 800 bzw. 1100 Bp artifiziell im Verlauf der Klonierungsprozedur einligiert wurden.

Die vorhergesagte kodierende Sequenz des Klons II-9 zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zur Proteindatenbank von MicroGenie. Jedoch besteht Verwandtschaft zwischen der vorhergesagten Aminosäuresequenz des 800 Bp großen Fragments und dem Vorläufer des sekretorischen Protein IV aus seminalen Vesikeln (32 % identische Positionen).

DNA- und Protein-Daten der beiden Klone AI-2 und AII-9 zeigen untereinander keine bemerkenswerte Ähnlichkeit. Obwohl für die beiden Klone keine eindeutige Homologie zu den bekannten Akrosinsequenzen besteht, kann aufgrund des Immunoprint-Analyse von AII-9 davon ausgegangen werden, daß dieser Klon Akrosin-ähnliche Sequenzen codiert. Ein besonders gewichtiges Argument für Akrosin-ähnliche Bereiche rührt daher, daß dieser Klon in der Immundetektion mit monoklonalen Antikörpern reagierte. Es verbleibt somit die Möglichkeit, daß Klon AII-9 für den bisher unbekannten carboxyterminalen Bereich von Akrosin codiert.

E. 3. Zusammenfassende Beurteilung

Es gibt vier Ebenen, von denen aus das Scheitern, DNA-Sequenzinformation von Akrosin zu erhalten, herrühren kann:

- 1.) DNA
 - a) die cDNA von Akrosin ist aufgrund von Überstrukturen prinzipiell nicht klonierbar
 - b) die cDNA ist nur in einer Richtung des Lambda-Vektors eingebaut und deswegen nicht in Protein umschreibbar
- 2.) mRNA
 - a) die mRNA für Akrosin liegt nur in poly-A⁻-Populationen vor
 - b) die mRNA-Synthese des Organspenders war gestört (inadäquater DNA-Spender)
- 3.) Protein

das von E.coli synthetisierte Akrosin stört das Wachstum des Wirts
- 4.) Antikörper

Antikörper gegen Eberakrosin kreuzreagieren nicht oder nur schwach mit Humanakrosin (inadäquater Antikörper)

Im folgenden werden die einzelnen Gesichtspunkte näher erläutert:

Wyman et al. stellten 1984 fest, daß es DNA-Sequenzen gibt, die einer Klonierung nicht zugänglich sind. Es handelt sich dabei um Sequenzen, die über inverse bzw. direkte Sequenzwiederholungen Sekundär-Strukturen ausbilden können. Ihre Untersuchung erfolgte an genomischer DNA, wo sie Sekundärstrukturen elektronenmikroskopisch nachweisen konnten. Dabei stellten sie fest, daß ganz bestimmte Klone nur auf recB⁻, recC⁻ bzw. sbcB-Mutationen von E.coli wachsen können, dagegen nicht auf rec⁺-Varianten. Der in dieser Arbeit verwendete E.coli-Stamm ist aber rec⁺. Für diese Hypothese sprechen auch eigene Versuche, eine testikuläre cDNA-Bank (aus Eber) im Lambda-Vektor gt 10 zu konstruieren, auf dem E.coli-Wirt (rec⁺) zu propagieren und Akrosin-DNA zu isolieren. Das Sichten dieser Bank erfolgte mit Hilfe von Oligonukleotiden, die nach Proteinsequenzdaten hergestellt worden waren (in dieser Arbeit nicht beschrieben). Trotz mehrerer Ansätzen gelang es nicht, das gewünschte Gen zu finden. Mög-

licherweise sind diese Ergebnisse dahingehend zu werten, daß Klone mit dem Akrosin-Gen auf rec^+ -Stämmen nicht wachsen können.

Der Einbau von DNA in einer Direktionalität ist eine weitere Möglichkeit, die bei der Klonierung des Akrosin-Gens aufgetretenen Schwierigkeiten zu erklären. In der vorliegenden Arbeit ist der unidirektionale Einbau beim Klonieren in den Sequenzierungsvektor M13 öfter beobachtet worden: zwei von vier DNA-Sequenzen wurden nur in einer Orientierung erhalten (II-9-8 und I-2). DNA, die nur in der non-kodogenen, nicht exprimierbaren, Orientierung eingebaut werden kann, entgeht der Detektion im Expressionstest.

Eine weitere diskutierbare Möglichkeit bezieht sich auf die mRNA-Ebene. Bekanntermaßen liegen ca. 33 % der gesamten mRNA-Population einer eukaryontischen Zelle nicht-polyadenyliert vor. Etwa ein Drittel, also 11 % der gesamten mRNA-Population kodiert dabei für Histon-Proteine. Der Rest (ca. 22 %) verteilt sich auf eine Vielzahl meist unbekannter Proteine. Es wird angenommen, daß diese mRNAs zwar zusätzlich in polyadenylierter Form vorkommen, das Verhältnis von poly-A⁺ zu poly-A⁻ aber in nicht näher bekanntem Maße von Protein zu Protein variieren kann (Lewin, 1985). Ausgehend von dieser Hypothese ist es denkbar, daß die mRNA-Population für Akrosin zum großen Teil keinen poly-A⁺-Schwanz enthält und damit der cDNA-Konstruktion entginge, die mit Oligo dT-Priming arbeitet (wie bei der getesteten Bank geschehen).

Die cDNA-Bank wurde aus menschlichem Testisgewebe hergestellt. Den Angaben des Herstellers (Dr. K. Fong, San Francisco, USA) zufolge wurde die Probe operativ von einem 50-jährigen "gesunden" Mann entfernt. Es ist unbekannt, welche Indikation zu dem operativen Eingriff führte. Ein andrologischer Defekt, z.B. eine Globozoospermie, ist nicht definitiv ausgeschlossen.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Detektion spezifischer Akrosin-Klone besteht in einer potentiellen Toxizität des Akrosins für den Wirtsorganismus *E.coli* (Winnacker, 1985). Da nicht anzunehmen ist, daß Akrosin in einer aktiven, zur Proteolyse fähigen Form synthetisiert wird, kann geschlossen werden, daß für die Toxizität der stark amphi-

phile Charakter des Proteins ausschlaggebend ist.

Der Ansatz, Antikörper gegen Eberakrosin für die Durchmusterung einer humanen Genbank zu benutzen, beruhte auf den Versuchen Schills et al., die 1975 feststellten, daß Humanakrosin und Eberakrosin mit Antikörpern gegen Eberakrosin kreuzreagierten. 1987 stellten jedoch Siegel et al. dieses Ergebnis mit der Feststellung in Frage, daß polyklonale Antikörper gegen menschliches Proakrosin nicht mit Eberproakrosin kreuzreagieren. Unsere eigenen Experimente zeigen jedoch, daß der humane cDNA-Klon II-9 im Plaquelift-Test mit monoklonalen Antikörpern gegen Eberakrosin kreuzreagiert. Ein ähnliches Ergebnis publizierten auch Elce et al., 1986.

Die Rolle von Akrosin für die Fusion der Keimzellen kann als gesichert angesehen werden. Aufgrund neuerer Ergebnisse über Lektin-ähnliche Eigenschaften von (Pro)Akrosin treten neben den bisher bekannten proteolytischen Fähigkeiten noch andere mögliche Funktionen dieser Spermienproteinasen in den Vordergrund. So kommt Akrosin durch die erwähnte Lektin-ähnliche Eigenschaft als Ligand für Spermienrezeptoren der Zona pellucida in Frage. Damit könnte Akrosin eine wichtige Rolle bei der Spezies-spezifischen Erkennung der Keimzellen spielen. Die genetische Analyse (cDNA-Sequenz, genomische Struktur, Expression in eukaryontischen Zellen) wird daher ohne Zweifel interessante neue Aspekte zutage bringen. Bei einem multifunktionellen Enzym wäre es sicherlich interessant, einzelne funktionelle Domänen getrennt zur Expression zu bringen und durch gezielte Mutagenese ihre Aktivität näher zu charakterisieren. Damit könnte auch die physiologische Bedeutung von Akrosin besser verstanden werden.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1987) *Sperm Cells and Fertilization*. In: *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York & London, pp. 769-811
- Anderson, D.J. & Blobel, G. (1983) Immunoprecipitation of Proteins From Cell-Free Translation. *Methods Enzymol.* 96, 111-120
- Anderson Jr., R. A., Beyler, S.A., Mack, S.R. & Zanefeld, L.J.D. (1981) Characterization of a High-Molecular Weight Form of Human Acrosin. *Biochem. J.* 199, 307-316
- Aviv, H. & Lederer, P. (1972) Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic-Acid-Cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412
- Axen, R., Porath, J., & Ernback, S. (1967) Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. *Nature* 214, 1302-1304
- Barrett, A.J. (1986) An Introduction to Proteinases. In: *Proteinase Inhibitors*, Barrett & Salvesen eds., pp. 3-22, Elsevier, Amsterdam
- Belt, K.T., Carroll, M.C. & Porter, R.R. (1984) The Structural Basis of the Multiple Forms of Human Complement Component C4. *Cell* 36, 907-914
- Berruti, G., McRorie, R.A. & Martegani, E. (1984) Acrosomal Activation of Sperm. In: *The Sperm Cell*, Andre, J. ed. pp 281-285
- Berruti, G., Merigioli, G. & Martegani, E. (1986) Biochemical Studies on Proacrosin and Acrosin from Epididymal Boar Spermatozoa: In Vitro Translation of Boar Testicular Proacrosin mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 139-145

Bleil, J.D. & Wassarman, P.M. (1980) Mammalian Sperm-Egg Interaction: Identification of a Glycoprotein in Mouse Egg Zonae Pellucida Possessing Receptor Activity for Sperm. *Cell* 20, 873-882

Bode, W. (1979) Aktivierung, Aktivität und Inhibierung des Rindertrypsins. *Naturwissenschaften* 66, 251-258

Bode, W. & Huber, R. (1986) Molecular and Cellular Basis of Digestion. Desnuell, P. ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 213-234

Brown, C.R. & Jones, R. (1987) Binding of Zona Pellucida Proteins to Boar Sperm Polypeptid of M_r 53.000 and Identification of Zona Moieties Involved. *Development* 99, 333-339

Chamberlain, J.P. (1979) Fluorographic Detection of Radioactivity on Polyacrylamide Gels with Watersoluble Fluor-Sodium-Salicylate. *Anal. Biochem.* 96, 632-636

Chang, W.C. (1951) Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa Deposited in the Fallopian Tube. *Nature* 168, 697-698

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299

Chung, D.W., Que, B.G., Rixon, M.W., Mace Jr., M., & Davie, E.W. (1983) Characterization of Complementary Deoxyribonucleic Acid and Genomic Deoxyribonucleic Acid for the β -Chain of Human Fibrinogen. *Biochemistry* 22, 3244-3250

Davie, E.W., Fukujikawa, K., Kurachi, K. & Kisiel, W. (1979) The Role of Serine Proteases in Blood Coagulation. *Adv. Enzymol.* 48, 277-318

Davis, L.G., Ditner, M.D. & Battey, J.F. (1986) Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co., Inc, New York

Elce, J.S., Graham, E.J., Zboril, G., Leyton, L., Perez, E., Croxatto, H.B. & De Joannes, A. (1986) Monoclonal Antibodies to Bovine and Human Acrosin. *Biochem. Cell Biol.* 64, 1242-1248

Fink, E., Schießler, H., Arnold, M. & Fritz, H. (1972) Isolierung eines Trypsin-ähnlichen Enzyms (Akrosin) aus Eberspermien. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1633-1637

Flechlón J.-E. (1987) Acrosome Reaction, Sperm Penetration and Gamete Fusion in Mammals. In: *New Horizons in Sperm Cell Research*, Mohri, ed. Japan Sci. Soc., Tokyo/Gordon and Breach Sci. Publ., New York, pp 235-246

Flörke-Gerloff, S., Krause, W., Töpfer-Petersen, E., Tschesche, H., Müller-Esterl, W. & Engel, W. (1985) On The Teratogenesis of Round-Headed Spermatozoa: Investigation With Antibodies Against Acrosin, an Intraacrosomally Located Acrosin Inhibitor and the Outer Acrosomal Membrane. *Andrologia* 17, 126-138

Fock-Nüzel, R. (1983) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität München

Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A. & Müller-Esterl, W. (1984) Boar Acrosin is a Two-Chain Molecule. Isolation and Primary Structure of the Light Chain, Homology with the Propart of Other Serin Proteinases. *Eur. J. Biochem.* 141, 441-446

Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A., Müller-Esterl, W. & Fritz, H. (1980) N-Terminal Amino-Acid-Sequence of Boar Sperm Acrosin. Homology with Other Serin Proteinases. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1823-1828

Fraker, P.J. & Speck, J.C. (1978) Protein and Cell Membrane Iodinations with a Sparingly Soluble Chloroamide, 1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-Diphenylglycouril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-875

Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Meier, M., Schießler, H. & Schirren, C. (1972) Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1943-1949

Garnier, J., Osguthorpe, D.J. & Robson, B. (1978) Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins. J. Mol. Biol. 120, 97-120

Garoff, H. & Ansorge, W. (1981) Improvements in DNA-Sequencing-Gels. Anal. Biochem. 115, 450-457

Galfré, G. & Milstein, C. (1981) Preparation of Monoclonal Antibodies. Methods Enzymol. 73, 3-46

Gilboa, E., Elkana, Y. & Rigbi, M. (1973) Purification and Properties of Human Acrosin. Eur. J. Biochem. 39, 85-92

Harris, S.E. Mansson, P.-E., Tully, D.B. & Burkhardt, B. (1983) Seminal Vesicle Secretion IV Gene: Allelic Difference Due to a Series of 20-Base-Pair Direct Tandem Repeats within an Intron. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 6460-6464

Hopp, T.P. & Woods, K.R. (1981) Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828

Hsu, S. & Fanger, H. (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) and Unlabelled Antibody (PAP) Procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580

Jackson, R.J. & Hunt, T. (1983) Preparation and Use of Nuclease-Treated Rabbit Reticulocyte Lysates for the Translation of Eukaryotic Messenger RNA. Methods Enzymol. 96, 50-74

Kaufmann, M., Schönwald, D., Mansouri, A. & Günther, E. (1987) Immunological Approach to Characterize Proacrosin and Various Acrosin Forms in Boar and Man by Monoclonal Antibodies. Gamete Res. 18, 349-361

Kennedy, W.P. & Polakoski, K.L. (1981) Evidence for an Intrazymogen Mechanism in the Conversion of Proacrosin into Acrosin. *Biochemistry* 20, 2240-2245

Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity. *Nature* 256, 495-497

Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophotting of Multiple Gels: A simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins From Polyacrylamide to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Lewin, B. *Genes II* (1985) ed. John Wiley & Sons, New York

Ludvic, W. (1976) *Andrologie*, Thieme Verlag, Stuttgart

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Marushige, Y. & Marushige, K. (1975) Enzymatic Unpacking of Bull Sperm Chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 403, 180-191

Meizel, S. & Lui, C.W. (1976) Evidence for the Role of a Trypsin-like Enzyme in Sperm. *J. Exp. Zool.* 195, 137-144

McRorie, R.A., Turner, R.B., Bradford, M.M. & Williams, W.L. (1976) Acrolysin, the Aminoproteinase Catalyzing the Initial Conversion of Proacrosin to Acrosin in Mammalian Fertilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 492-498

Mindermann, R., (1980) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität München

Moon, K.E., Gorski, J.P. & Hugli, T.E. (1981) Complete Primary Structure of Human C4a Anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* 256, 8685-8692

Morton, D.B. (1975) Acrosomal Enzymes: Immunochemical Localization of Acrosin and Hyaluronidase in Ram Spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 45, 375-378

Morton, D. B. (1977) The Occurrence and Function of Proteolytic Enzymes in the Reproductive Tract of Mammals. In: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, Barret, A.J., ed., Amsterdam, pp. 445-500

Müller-Esterl, W. (1986) Kininogens. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.-U., ed., Verlag Chemie, Weinheim, pp. 304-316

Müller-Esterl, W. & Fritz, H. (1980) Interactions of Boar Acrosin with Detergents. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1673-1682

Neurath, H. (1964) Protein Digesting Enzymes. *Sci. Amer.* 210, 86-79

Neurath, H. (1984) Evolution of Proteolytic Enzymes. *Science* 224, 350-357

Neurath, H. & Walsh, K.A. (1976) Role of Proteolytic Enzymes in Biological Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3825-3832

N.n.: *M13 Cloning & Sequencing Handbook* (Fa. Amersham)

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. (1980) A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363

O'Rand, M.G., Welch, J.E. Fisher, S.J. (1986). Sperm Membrane and Zona Pellucida Interactions During Fertilization. In: *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction*. Dhindsa, D.S. & Bahl, O. eds., Plenum, New York. pp 131-144

Parrish, R.F., Strauss, J.W., Polakoski, K.L. & Dombrose, F.A. (1978) Phospholipid Vesicle Stimulation of Proacrosin Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 149-152

Patthy, L. (1985) Evolution of the Proteinases of Blood Coagulation and Fibrinolysis by Assembly from Modules. *Cell* 41, 657-663

Pelham, H.R.B. & Jackson, R.J. (1976) An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Retikuloocyte Lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256

Podell, S.B. & Vaquier, V.D. (1984) Inhibition of Sea Urchin Sperm Acrosome Reaction by Antibodies Directed Against Two Sperm Membrane Proteins. *Exp. Cell Res.* 155, 467-476

Polakoski, K. L. & Parrish, R. F.; (1977) Boar Acrosin: Purification and Preliminary Activation Studies of Proacrosin Isolated From Ejaculated Boar Sperm. *J. Biol. Chem.* 252, 1888-1894

Polakoski, K.L. & Siegel, M.S. (1986) The Proacrosin - Acrosin - System. In: *Andrology: Male Fertility and Sterility*, Paulson, J.D., Negro-Vilar, A., Lucena, E. & Martini, L. ed., Academic Press, Inc., Orlando, pp. 359-375

Reid, K.B.M. & Porter, R.R. (1981) The Proteolytic Activation Systems of Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 433-464

Saling, P.M. (1981) Involvement of Trypsin-like Activity in Binding of Mouse Spermatozoa to Zonae Pellucidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6231-6235

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA-Sequencing With Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467

Schill, W.B. & Haberland, G.L. (1974) Kinin-Induced Enhancement of Sperm Motility. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 229-231

Schill, W.-B., Schleuning, W.-D., Fritz, H., Wendt, V. & Heimburger, N. (1975) Immunofluorescent Localization of Acrosin in Spermatozoa by Boar Acrosin Antibodies. *Naturwissenschaften* 62, 540-541

Schleuning, W.-D., Hell, R. & Fritz, H. (1976) Multiple Forms of Boar Acrosin and Their Relationship to Proenzym Activation. Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem. 357, 207-212

Schumacher, G.F.B. & Zanefeld, L.J.D. (1974) Proteinase Inhibitors in Human Cervical Mucus and Their in Vivo Interaction with Human Acrosin. In: Proteinase Inhibitors, Bayer Symp. V, Fritz, H. Tschesche, H. Greene, L.J. & Truscheit, E. eds., Springer Verlag, Berlin, pp 178-186

Siegel, M.S., Bechtold, D.S., Willand, J.L. & Polakoski, K.L. et al. (1987) Biochemical and Immunological Comparisons Between the Human and Boar Proacrosin-Proacrosin Proteinase System. J. Reprod. Immunol. 11, 307-319

Siegel, M.S., Cook, K.S. & Polakoski, K.L. (1984) Demonstration of Sperminogen In Extracts of Boar Spermatozoa. Am. Soc. Androl., Los Angeles,

Stambaugh, P. & Buckley, J. (1968) Zona Pellucida Dissolution Enzymes of The Rabbit Sperm Head. Science 161, 585-586

Strauss, E.C., Kobori, J.A. Siu, G. & Hood, L.E. (1986) Specific-Primer-Directed DNA Sequencing. Anal. Biochem. 154, 353-360

Stroud, R.M. (1976) A Family of Protein-Cutting Proteins. Sci. Amer. 131, 74-88

Subba, R.P.V., McCartney-Francis, N.L. & Metcalfe, D.D. (1983) An Avidin-Biotin Micro-ELISA for Rapid Measurement of Total and Allergen-Specific Human IgE. J. Immunol. Meth. 57, 71-85

Tobias, P.S. & Schumacher, G.F.B. (1977) Observations of two Proacrosins in Extracts of Human Spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 434-439

Töpfer-Petersen, E. & Henschen, A. (1987a) Acrosin Shows Zona and Fucose Binding, Novel Properties for a Serin Proteinase. FEBS Lett. 226, 38-42

Töpfer-Petersen, E., Friess, A.E., Henschen, A. & Schill, W.-B. (1987b) Is a Fucose-Binding Protein Involved in Sperm-Egg Interaction in the Pig? In: New Horizons in Sperm Cell Research, Mohri, ed. Japan Sci. Soc., Tokyo/Gordon and Breach Sci. Publ., New York, pp 287-296

Töpfer-Petersen, E. & Henschen, A. (1988a) Zona Pellucida Binding and Fucose Binding of Boar Sperm Acrosin is not Correlated with Proteolytic Activity. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 69-76

Töpfer-Petersen, E. & Henschen, A. (1988 b) FEBS-Lett. in Druck

Tschesche, H., Wittig, B., Decker, G., Müller-Esterl, W. & Fritz, H. (1982) A New Acrosin Inhibitor from Boar Spermatozoa. Eur. J. Biochem. 126, 99-104

Vaquier, V.D. (1986) Activation of Sea Urchin Spermatozoa During Fertilization. Trends Biochem. Sci. 11, 77-81

Voglmayr, J. K. (1987) Surface Protein Changes in Ram Spermatozoa during Maturation and Capacitation. In: New Horizons in Sperm Cell Research, Mohri, ed. Japan Sci. Soc., Tokyo/Gordon and Breach Sci. Publ., New York, pp 3-18

Voller, A. (1980) Heterogeneous Enzyme-Immunoassays and Their Applications. In: Enzyme-Immunoassay, Maggio, E.T. (ed.), CRC Press, Boca Raton, pp 181-196

Wassarman, P.M. (1987) The Biology and Chemistry of Fertilization. Science 235, 553-560

Wiman, B. & Collen, D. (1978) Molecular Mechanisms of Physiological Fibrinolysis. Nature 272, 549-550

Winnacker, E.-L. (1985) Gene & Klone Verlag Chemie, Weinheim

Wyman, A., Wolfe, L.B. & Botstein, D. (1985) Propagation of Some Human DNA-Sequences in Bacteriophage Lambda Vectors Requires Mutant E.coli Hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2880-2884

Yamane, J. (1930) The Proteolytic Action of Mammalian Spermatozoa and its Bearing Upon the Second Maturation Division of Ova. *Cytologia* 1, 394-403

Yamane, J. (1935) Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneis. *Cytologia* 6, 474-483

Yanagimachi, R. (1987) The Acrosome Reaction: Analysis of Its Mechanism Using Guinea Pig Spermatozoa. In: *New Horizons in Sperm Cell Research*, Mohri, ed. Japan Sci. Soc., Tokyo/Gordon and Breach Sci. Publ., New York, pp 19-29

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983) Efficient Isolation of Genes by Using Antibody Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1194-1198

Zanefeld, L.J.D., Polakoski, K.L., Robertson, R.T. & Williams, W.L. (1970) Proteinase Inhibitors, *Proc. Int. Res. Conf.*, 1st., Munich, de Gryter, Berlin, p. 236

Zanefeld, L.J.D., Schumacher, G.F.B. & Travis, J. (1973) Human Sperm Acrosomal Proteinase: Antibody Inhibition and Immunologic Dissimilarity to Pancreatic Trypsin. *Fertil. Steril.* 24 479-484

BAP	Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
DFP	Diisopropylfluorphosphat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fötales Kälberserum
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galaktosid
kB	Kilobasenpaare
Mr	relative Molekülmasse
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque forming units
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -galaktopyranosid

Name:	<u>Ralph Maria Simler</u>
Geburtsdatum:	24. Februar 1957
Geburtsort:	Waldsassen (Oberpfalz)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern	Hans Simler Waldtraud Simler, geb. Wassermann
1963 - 1967	Grundschule in Geiersthal/Bayr. Wald
1967 - 1976	Gymnasium der Regensburger Domspatzen
Juni 1976	Abitur
1976 - 1977	Studium der Physik an der LMU-München
1977 - 1983	Studium der Chemie an der LMU-München
1980	Vordiplom-Prüfung
1982	Hauptdiplom-Prüfung
von November 1982 bis Dezember 1983	Diplomarbeit im Max-Planck-Institut Martinsried; Thema: "Proteinchemische Untersuchung am Glyzinrezeptor der Ratte"
von Mai 1984 bis Mai 1988	Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Abteilung für Klin. Chemie und Klin. Biochemie in der chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München

München, im Juli 1988

